

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**TESIS DOCTORAL**

**Silenciamiento presináptico por el receptor CB1 de  
cannabinoides**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Beatris Alonso Legisamon**

Director

**José Sánchez-Prieto Borja**

**Madrid, 2017**

# Universidad Complutense de Madrid

## Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



## Silenciamiento presináptico por el receptor CB1 de cannabinoides

Beatris Alonso Legisamon

Tesis Doctoral

Madrid, 2016



**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Veterinaria**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

**Silenciamiento presináptico por el receptor CB1 de  
cannabinoides**

Memoria presentada por: Beatris Alonso Legisamon

para optar al grado de Doctora

Director de tesis: Dr. José Sánchez-Prieto Borja

Vº Bº Director

Dr. José Sánchez-Prieto Borja





## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	15
I INTRODUCCIÓN .....	19
1. El cerebelo .....	19
1.1. Estructura y función .....	19
1.2. Vías de señalización.....	21
2. La sinapsis glutamatérgica .....	22
2.1. La sinapsis.....	22
2.2. La sinapsis glutamatérgica .....	24
2.3. El terminal sináptico .....	26
2.4. El ciclo de las vesículas sinápticas .....	32
2.5. Grupos ó " <i>pools</i> " de vesículas sinápticas .....	42
3. El sistema endocannabinoide .....	44
3.1. Síntesis de endocannabinoides .....	45
3.2. Receptores de cannabinoides .....	45
3.3. Degradación .....	47
3.4. Plasticidad mediada por cannabinoides.....	49
4. Señalización por AMPc .....	52
5. Sinapsis silentes.....	56
II OBJETIVOS .....	63
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1. Materiales .....	67
1.1. Material biológico .....	67
1.2. Equipos.....	69
1.3. Reactivos, anticuerpos y fármacos.....	70
1.4. Medios.....	72
2. Métodos .....	75
2.1. Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata y ratón.....	75
2.2. Experimentos de imagen.....	78
2.3. Silenciamiento del gen de Epac2 con siARN .....	90
2.4. Inmunocitoquímica post-hoc .....	93

## ÍNDICE

2.5. Genotipado de los ratones carentes de la proteína RIM1 $\alpha$ .....	96
2.6. Acumulación de AMPc .....	97
2.7. Microscopía electrónica .....	99
3. Estadística y ajustes.....	101
IV RESULTADOS .....	105
1. El silenciamiento no se revierte por un incremento en la concentración de calcio extracelular [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub> .....	106
2. El silenciamiento requiere una activación prolongada del receptor CB1 .....	108
3. Posibles proteínas de la maquinaria exocitótica implicadas en el silenciamiento .....	109
4. El silenciamiento es inducido también por otros agonistas del receptor CB1.....	116
5. El silenciamiento presináptico es un fenómeno transitorio .....	117
6. El silenciamiento también se induce con el endocannabinoide 2-araquidonilglicerol.	121
7. El silenciamiento presináptico está relacionado con una reducción en los niveles de AMPc .....	122
8. El aumento de los niveles de AMPc acelera la reversión del silenciamiento .....	125
9. Otros GPCRs podrían afectar el silenciamiento .....	127
10. Epac2 está implicada en la prevención del silenciamiento presináptico.....	128
11. La activación de Epac2 también acelera la reversión del silenciamiento .....	134
12. Epac2 podría afectar al silenciamiento mediante la activación de PLC .....	137
13. Papel de RIM1 $\alpha$ en el silenciamiento.....	141
14. La activación de Epac acerca las vesículas sinápticas a la membrana de la zona activa	143
V DISCUSIÓN.....	148
1. La activación prolongada del receptor CB1 induce el silenciamiento presináptico.....	148
2. Marcadores presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento.....	149
3. Transitoriedad del silenciamiento y relevancia fisiológica.....	150
4. Silenciamiento y AMPc.....	152
5. Implicación de la proteína Epac2 en el silenciamiento .....	153
6. Implicación de la PLC en el silenciamiento presináptico.....	154
7. RIM1 $\alpha$ como diana de la maquinaria exocitótica del silenciamiento .....	156
8. Redistribución de las vesículas sinápticas .....	158
VI CONCLUSIONES .....	163
VII BIBLIOGRAFÍA.....	168

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I-1.</b> Estructura del cerebelo.....	20
<b>Figura I-2.</b> Dominios estructurales de las proteínas presinápticas RIM y Munc13.....	27
<b>Figura I-3.</b> Representación esquemática del acercamiento de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática por medio de interacciones entre las proteínas de la zona activa.....	30
<b>Figura I-4.</b> Vías de exo- y endocitosis.....	33
<b>Figura I-5.</b> Dominios estructurales de las proteínas SNARE. Interacción de Munc18 con las proteínas SNARE durante la exocitosis..	34
<b>Figura I-6.</b> Ciclo de las proteínas SNARE y fusión de las vesículas sinápticas dependiente de calcio..	36
<b>Figura I-7.</b> Tras la liberación del neurotransmisor las vesículas sinápticas son recuperadas mediante diferentes tipos de de endocitosis.....	40
<b>Figura I-8.</b> Modelo que muestra los distintos grupos de vesículas y su distribución.....	43
<b>Figura I-9.</b> Componentes del sistema endocannabinoide en el cerebelo. ....	48
<b>Figura I-10.</b> Estructura esquemática de las proteínas Epac. ....	54
<b>Figura I-11.</b> Tipos de sinapsis silentes.....	56
<b>Figura III-1.</b> Esquema del plásmido vGlut1-pHluorina empleado para transfectar a las células granulares de cerebelo a ODIV. El esquema es cortesía del Dr. D. Bartolomé-Martín. ....	77
<b>Figura III-2.</b> Estructura y protocolo de uso de las sondas FM.....	80
<b>Figura III-3.</b> Esquema de los protocolos empleados para los experimentos de FM1-43.....	82
<b>Figura III-4.</b> Imagen de un campo de células granulares cargadas con FM1-43 previa a la realización del experimento.....	84
<b>Figura III-5.</b> Imagen de contraste de fases obtenida tras experimento con FM1-43. ....	85
<b>Figura III-6.</b> Estudio del ciclo vesicular mediante vGlut1-pHluorina.....	87
<b>Figura III-7.</b> Protocolos gráficos empleados para las células transfectadas con vGlut1-pHluorina.....	89
<b>Figura III-8.</b> Esquema del método de extensión catalizado por la Taq polimerasa..	92
<b>Figura III-9.</b> Ejemplo teórico de curvas de amplificación tras una RT-PCR. Se pueden ver los valores de $C_T$ de dos muestras. La diferencia entre ambas ( $\Delta C_T$ ) refleja la diferencia en el número relativo de copias de ARNm en cada una. ....	93
<b>Figura III-10.</b> Inmunocitoquímica post hoc. ....	95
<b>Figura III-11.</b> Gel de agarosa resultado del genotipado de ratones. ....	97
<b>Figura III-12.</b> Fundamento de la técnica del kit comercial usada para medir los niveles de AMPc..	98
<b>Figura IV-1.</b> El tratamiento con cannabinoides induce un déficit de descarga de FM-1-43 que persiste a 5 mM de $Ca^{2+}$ extracelular. ....	107
<b>Figura IV-2.</b> El silenciamiento requiere un tratamiento prolongado con HU210 y es independiente de la concentración de calcio extracelular. ....	109
<b>Figura IV-3.</b> Protocolo empleado en los experimentos de FM1-43 post hoc..	110
<b>Figura IV-4.</b> El grado de descarga depende de la ratio RIM1 $\alpha$ /CB1R. ....	111
<b>Figura IV-5.</b> El grado de descarga es independiente del contenido de la proteína Munc13-1.....	113
<b>Figura IV-6.</b> Las proteínas Bassoon y Rab3 influyen sobre el grado de descarga de la sonda FM1-43. ....	114
<b>Figura IV-7.</b> El agonista cannabinoide WIN55512 induce el silenciamiento de los botones sinápticos.....	117
<b>Figura IV-8.</b> El silenciamiento inducido por el cannabinoide HU210 es transitorio .....	119
<b>Figura IV-9.</b> Sólo una subpoblación de botones sinápticos es susceptible al silenciamiento inducido por HU210..	120

<b>Figura IV-10.</b> El endocannabinoide 2-araquidonilglicerol también induce el silenciamiento presináptico.....	122
<b>Figura IV-11.</b> La inhibición de la adenilato ciclasa con SQ22536 también induce el silenciamiento presináptico y ocluye el inducido por HU210.....	124
<b>Figura IV-12.</b> La inhibición de la adenilato ciclada con SQ22536 también induce el silenciamiento presináptico y ocluye el inducido por WIN55512.....	125
<b>Figura IV-13.</b> El incremento en los niveles de AMPc con forskolina acelera la activación de los botones previamente silenciados por HU210.....	126
<b>Figura IV-14.</b> El agonista de los receptores beta adrenérgicos isoproterenol previene el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides..	127
<b>Figura IV-15.</b> La supresión de la expresión de Epac2 con siARN produce un aumento no significativo del silenciamiento, pero previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210.....	130
<b>Figura IV-16.</b> El tratamiento con siARN de Epac1 no altera los niveles del ARNm de Epac2. ..	131
<b>Figura IV-17.</b> La supresión de la expresión de Epac1 con siARN no aumenta el silenciamiento, ni previene la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210.....	132
<b>Figura IV-18.</b> El inhibidor de Epac2 ESI05 produce un aumento significativo del silenciamiento y previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210..	134
<b>Figura IV-19.</b> El inhibidor específico de Epac 2, ESI05, previene la reactivación acelerada por 8pCpt de los botones sinápticos silenciados por HU210. ....	136
<b>Figura IV-20.</b> Imagen representativa de la fluorescencia de algunos botones sinápticos tras los dos pulsos de despolarización (KCl) y los dos pulsos de NH <sub>4</sub> Cl en las distintas condiciones experimentales mostradas en la Figura IV-19.....	137
<b>Figura IV-21.</b> El inhibidor de PLC U-73122 produce un aumento significativo del silenciamiento y previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210...	139
<b>Figura IV-22.</b> El inhibidor específico de PLC U73-122, previene la reactivación acelerada por 8pCpt de los botones sinápticos silenciados por HU210. ....	140
<b>Figura IV-23.</b> Silenciamiento presináptico inducido por HU210 en células granulares de ratón de genotipo salvaje, KO para RIM1α y KO para RIM1α y rescatadas con RIM1α. ....	142
<b>Figura IV-24.</b> 8pCpt revierte el alejamiento de las vesículas sinápticas de la membrana de la zona activa inducido por HU210. ....	144

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla III-1.</b> Equipos utilizados en cultivos y electroporación.....	69
<b>Tabla III-2.</b> Equipos de adquisición de imagen.....	69
<b>Tabla III-3.</b> Equipos utilizados para el genotipado .....	69
<b>Tabla III-4.</b> Equipo utilizado para medir la acumulación de AMPc .....	69
<b>Tabla III-5.</b> Material de cultivos .....	70
<b>Tabla III-6.</b> Reactivos y sondas .....	70
<b>Tabla III-7.</b> Reactivos para el silenciamiento de la expresión de proteínas.....	70
<b>Tabla III-8.</b> Reactivos utilizados en el genotipado .....	71
<b>Tabla III-9.</b> Fármacos utilizados en imagen y microscopía electrónica de células.....	71
<b>Tabla III-10.</b> Reactivos usados para medir la acumulación de AMPc.....	71
<b>Tabla III-11.</b> Reactivos y anticuerpos usados para inmunodetección.....	72
<b>Tabla III-12.</b> Reactivos utilizados en microscopía electrónica de células .....	72
<b>Tabla III-13.</b> Composición del medio I.....	72
<b>Tabla III-14.</b> Composición del medio II.....	73
<b>Tabla III-15.</b> Composición del medio de cultivo Neurobasal suplementado .....	73
<b>Tabla III-16.</b> Composición de los medios HBM .....	73
<b>Tabla III-17.</b> Composición del medio suplementado .....	74
<b>Tabla III-18.</b> Reactivos para la reacción de retrotranscripción .....	74
<b>Tabla III-19.</b> Reactivos para la reacción de RT-PCR.....	74
<b>Tabla III-20.</b> Composición PBS.....	74
<b>Tabla III-21.</b> Composición mezcla de digestión.....	74
<b>Tabla III-22.</b> Mezcla de reacción de la PCR .....	75
<b>Tabla III-23.</b> Composición TAE .....	75
<b>Tabla III-24.</b> Composición de los tampones y fijadores .....	75
<b>Tabla III-25.</b> Condiciones retrotranscripción .....	91
<b>Tabla III-26.</b> Características cebadores KO RIM1 $\alpha$ .....	96
<b>Tabla III-27.</b> Condiciones de la PCR.....	97



**ABREVIATURAS**

**2-AG**- 2 araquidonil glicerol

**AA**- Ácido araquidónico

**AC**- Adenilato ciclasa

**AEA**- Anandamida

**AMPA**-  $\alpha$ -amino-hidroxi-5metilisoxazolil-4-propionato

**AMPc**- Adenosina monofosfato cíclico

**AP-1/AP-2/AP-3/AP-180**- Proteína adaptadora 1/2/3/180

**AUF**- Unidades arbitrarias de fluorescencia

**BSA**- Albúmina de suero bovino

**CaM**- Calmodulina

**CASK**- Serina quinasa dependiente de Ca/Calmodulina

**CB1R/CB2R**- Receptor de cannabinoides tipo 1/2

**Cdk5**- Quinasa dependiente de ciclina 5

**CNB** (dominio)- Dominio de unión a nucleótidos cíclicos

**COX**- Ciclooxygenasa

**CPS**- Cysteine String Protein

**DAG**- Diacil glicerol

**DAL**- Diacil glicerol lipasa

**DAPI**- 4',6-diAmidino-2-FenilIndol

**DEP** (dominio)- Dishevelled, Egl-10 y Plecstrina

**DIV**- Días *in vitro*

**DSE**- Supresión de la excitación inducida por despolarización

**DSI**- Supresión de la inhibición inducida por despolarización

**EAAT**- Transportador de aminoácidos excitatorios

**EBSS**- Solución de sales equilibrada de Earl

**eCB**- Endocannabinoides

**EGFP**- Proteína verde fluorescente potenciada

**ELA**- Esclerosis lateral amiotrófica

**ELKS/CAST**- Citomatriz de la proteína estructural de la zona activa

**Epac**- Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPc

**EPSC**- Corriente postsináptica excitatoria

**FAAH**- Amido hidrolasa de ácidos grasos

**FAM**- 6-carboxifluoresceína

**FITC**- Fluoresceína IsoTioCianato



## ABREVIATURAS

**FM1 (sonda)**- *Fei Mao 1*

**FRET**- Transferencia de energía de resonancia de Förster

**GABA**- Ácido  $\gamma$ -amino butírico

**GAPDH**- Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**GDP**- Guanosin difosfato

**GEF**- Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

**GFP**- Proteína verde fluorescente

**GMPC**- Guanosin monofosfato cíclico

**GPCR**- Receptor acoplado a proteínas G)

**GTP**- Guanosina trifosfato

**GTPasa**- Guanosina trifosfatasa

**HBM**- Medio tamponado con HEPES

**HU210**- Agonista cannabinoide Hebrew University 210

**IBMX**- 3-Isobutyl-1-methylxanthine

**iGluR**- Receptor de glutamato ionotrópico

**IP3**- Inositol trifosfato

**IPSC**- Corriente inhibitoria postsináptica

**KO**- Knock-out

**LAR**- Tirosina fosfatasa transmembrana

**LOX**- Lipooxigenasa

**LTD**- Depresión a largo plazo

**LTP**- Potenciación a largo plazo

**MAP1**-Proteína asociada a microtúbulos 1

**mEPSC**- Corriente excitatoria postsináptica miniatura

**MGL**-Mono acil glicerol lipasa

**mGluR**- Receptor de glutamato metabotrópico

**Munc13/Munc18**- Proteína homóloga de mamífero de UNCoordinated phenotype 13/18

**NAPE**- N-araquidonil fosfatidiletanolamina

**NMDA**- N-metil-D-aspártico

**NO**- Óxido nítrico

**NSF**- Factor sensible a N-ethylmaleimida

**PBS**- Tampón fosfato salino

**PDE**- Fosfodiesterasa

**PDZ**- Dominio PDZ

**PIP2**- Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato

## ABREVIATURAS

**PKA**- Proteína quinasa dependiente de AMPc  
**PKC**- Proteína quinasa C  
**PLC/PLD**- fosfolipasa C/D  
**RA**- Dominio RA  
**Rab**- Ras en el cerebro  
**RIM**- Proteína de interacción con Rab  
**RIM-BP**- Proteína de unión a RIM  
**RRP**- Readily Releasable Pool  
**SAP**- Dominio SAP  
**siARN**- ARN de silenciamiento  
**SNAP**- Proteína asociada a sinaptosomas  
**SNARE**- Receptor de SNAP  
**SNC**- Sistema nervioso central  
**STD**- Plasticidad a corto plazo  
**TRPV1**- Receptor transitorio de vaniloides tipo 1  
**VAMP**- Proteína vesicular asociada a membrana, sinaptobrevina  
**vATPasa**- ATP-asa vacuolar  
**vGlut**- Transportador vesicular de glutamato  
**VIC**- 4,7,2'-triclono-7'-fenil-6-carboxifluoresceína  
**VS**- Vesícula sináptica



**RESUMEN**

Los receptores de cannabinoides de tipo CB1 son los receptores acoplados a proteínas G más abundantes en el cerebro. Se localizan en la presinapsis, donde inhiben la liberación de neurotransmisor en las sinapsis excitatorias del SNC tanto a corto como a largo plazo. Los efectos a corto plazo se deben a la inhibición de la entrada de calcio mediada por los canales de calcio dependientes de voltaje, así como a la apertura de canales de potasio, lo que disminuye globalmente la excitabilidad de la neurona presináptica de forma transitoria (*STD*, *Short-Term Depression*). Los cannabinoides también inhiben la transmisión sináptica a largo plazo LTD (*Long-Term Depression*) debido a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y la disminución de los niveles de AMP cíclico (Heifets y Castillo, 2009). Esta disminución parece afectar a la maquinaria exocitótica de forma persistente. La inducción de la LTD requiere tiempos de activación del receptor CB1 mayores que los requeridos para la inducción de los fenómenos de STD (Chevalleyre y Castillo, 2003; Ronesi *et al.*, 2004). Una de las regiones donde más se han estudiado los cambios duraderos en la transmisión sináptica por activación de receptores CB1 es en el cerebelo. Las sinapsis que forman las fibras paralelas de la células granulares con las células de Purkinje experimentan una forma de LTD dependiente de cannabinoides. La inducción de la LTD en estas sinapsis requiere una exposición prolongada al cannabinoide concomitante con la estimulación de la fibra aferente (Safo y Regehr 2005) mientras que el mantenimiento de la LTD parece requerir óxido nítrico (NO) generado en la presinapsis que difundiría hasta la postsinapsis manteniendo la LTP (Shibuki y Okada, 1991, Aiba *et al.*, 1994).

Trabajos previos de este laboratorio han mostrado una gran heterogeneidad en la respuesta exocitótica de sinapsis individuales a los cannabinoides. Si bien muchos de los botones sinápticos muestran una exocitosis fuertemente inhibida, en otra subpoblación de botones sinápticos los cannabinoides anulan por completo la respuesta exocitótica por lo que a estos botones sinápticos se les denomina silentes. Así, botones activos en términos de función presináptica pierden su capacidad de exocitosis tras la activación prolongada con el agonista cannabinoide. Estas sinapsis silentes se caracterizan por ser incapaces de liberar neurotransmisor tras la llegada de un potencial de acción pese a experimentar una entrada de calcio normal y contar con todas las proteínas de la maquinaria exocitótica (Cousin y Evans, 2011; Crawford y Mennerick, 2012).

El objetivo de este estudio ha sido estudiar los mecanismos moleculares del silenciamiento inducido por la activación del receptor CB1 en neuronas granulares de cerebelo. Para ello hemos utilizado técnicas de imagen en célula viva que permiten la monitorización del ciclo vesicular. En algunos experimentos hemos utilizado la sonda fluorescente FM1-43, mientras que en la gran mayoría se ha empleado vGlut1-pHluorina, una variante del transportador vesicular de glutamato de tipo 1 unida a la

proteína verde fluorescente que al pH ácido intravesicular no emite señal, y sí lo hace cuando el pH es neutro, esto es durante la exocitosis de dicha vesícula.

Experimentos en células transfectadas con vGlut1-pHluorina demostraron que la inhibición de la adenilato ciclasa con SQ22536 incrementa el porcentaje de botones silentes y ocluye el silenciamiento producido por el tratamiento con HU210, indicando que la disminución en los niveles de AMPc parece ser responsable del silenciamiento.

Observamos que el proceso del silenciamiento es un fenómeno reversible ya que 20 minutos después de inducir el silenciamiento los botones sinápticos silenciados son capaces de responder a la estimulación con la exocitosis de neurotransmisor. También hemos encontrado que el endocannabinoide 2-AG (2-araquidonilglicerol), junto con un inhibidor de la monoacilglicerol lipasa como JZL184 para impedir su degradación, es capaz de inducir el silenciamiento presináptico, lo que sugiere la posible relevancia fisiológica de este fenómeno.

Resultados previos del laboratorio habían mostrado que el silenciamiento es independiente de la PKA (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Esta nueva vía parece implicar a la proteína Epac, factor intercambiador de nucleótidos de guanina dependiente de AMPc, que es una diana de AMPc alternativa a la vía PKA. Epac presenta dos isoformas, Epac1 con una baja expresión en el SNC, y Epac2 que se expresa abundantemente en el cerebro incluido el cerebelo (Kawasaki *et al.*, 1998). Para explorar el papel de la Epac en el silenciamiento presináptico, usamos siARN de la isoforma 2 e inhibición farmacológica de la misma. En estos experimentos encontramos que la supresión de la expresión de Epac2, al igual que la inhibición mediante ESI-05, anuló el efecto del activador específico de Epac 8pCpt para prevenir y revertir la inducción del silenciamiento, demostrando la implicación de esta isoforma en el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides.

Las proteínas EPAC están implicadas en la potenciación de la liberación de neurotransmisor dependiente de AMPc (Gekel y Neher, 2003), así como en la potenciación de liberación de glutamato dependiente del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Ferrero *et al.*, 2013). Con el propósito de estudiar la posible implicación de la PLC $\epsilon$  en el silenciamiento usamos un inhibidor de la PLC. Así, observamos que la incubación con el inhibidor U73122 revirtió completamente capacidad de 8pCpt para prevenir y revertir el silenciamiento inducido por los cannabinoides. Así, la actividad de PLC parece estar implicada en la vía de señalización activada por el receptor CB1 para silenciar los botones sinápticos.

Finalmente hemos encontrado que el silenciamiento presináptico inducido por cannabinoides se asocia a un bajo contenido en la proteína de la zona activa RIM1 $\alpha$  y a un alto contenido en receptor CB1. Para profundizar en el papel de RIM1 $\alpha$  en el silenciamiento realizamos cultivos de células granulares de cerebelo que procedían de

## RESUMEN

ratones carentes de esta proteína. Hemos encontrado que células que carecen de RIM1 $\alpha$  tienen más botones silentes en condiciones basales que las células control y que el silenciamiento aumenta significativamente tras el tratamiento con HU210. Además, los botones silentes como consecuencia de la carencia RIM1 $\alpha$  son insensibles a la activación de la proteína Epac por 8pCpt, sugiriendo que esta proteína se sitúa en alguna etapa anterior de las proteínas RIM en la cascada de señalización.



**SUMMARY**

Cannabinoid type 1 receptors (CB1R) are one of the most abundant G protein-coupled receptors in the brain. They mediate short-term retrograde inhibition of neurotransmitter release, as well as long-term depression of synaptic transmission at excitatory synapses. The short-term depression (STD) effects are due to the inhibition in  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-gated calcium channels and the opening of potassium channels, which both reduce neuronal excitability. Long-term depression (LTD) is related to adenylate cyclase (AC) inhibition and decrease in cAMP levels (Heifets and Castillo, 2009), which targets the exocytotic machinery. LTD induction requires longer CB1R activation than STD (Chevalleyre and Castillo, 2003; Ronesi *et al.*, 2004). Long-term effects of CB1R have been extensively studied in cerebellum. Synapses established between parallel fibers of cerebellar granule cell and Purkinje cells undergo cannabinoid-induced LTD. Its induction requires prolonged exposure to cannabinoids simultaneous to parallel fiber stimulation (Safo and Regehr 2005) and its maintenance seems to be dependent on nitric oxide (NO) which is generated in the presynaptic compartment and diffuses to the postsynapsis sustaining LTD (Shibuki and Okada, 1991, Aiba *et al.*, 1994).

Previous work in the laboratory has demonstrated that synaptic boutons respond in a heterogeneous way to cannabinoids. More of the boutons show inhibited exocytotic response but a subpopulation of synaptic boutons that were previously active do not respond to depolarization behaving as silent boutons. Presynaptically silent boutons are synapses containing full complement of exocytotic release proteins that fail to release neurotransmitter in response to a strong depolarization and  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Cousin and Evans, 2011; Crawford and Mennerick, 2012).

The purpose of this work has been to study the molecular mechanisms behind CB1-activation-dependent presynaptic silencing in cerebellar granule cells. We have used live cell imaging techniques which allow vesicular cycle monitoring. Some experiment have been performed with FM1-43 fluorescent dye, while most of them have been performed with vGlut1-pHluorin, a pH-sensitive form of green fluorescent protein (GFP) fused to the luminal side of the glutamate vesicular transporter. Its fluorescence is dim upon acidification of the synaptic vesicle, but increases during vesicular fusion.

Adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 increased the number of silent synaptic boutons in vGlut1-pHluorin transfected cells and occluded the ability of HU210, to induce further silencing, suggesting that CB1R-induced silencing caused by the decrease in cAMP levels.

We observed that presynaptic silencing is a transient phenomenon as after 20min of the agonist withdrawal silent boutons became active. We also have shown



that 2-AG treatment combined with the monoacyl glycerol lipase (MGL) inhibitor JZL184 induces presynaptic silencing indicating the possible physiological role of the process.

Previous results have shown that presynaptic silencing does not involve protein kinase A (PKA) (Ramírez-Franco *et al.*, 2014). This pathway seems to involve Epac proteins, a guanine nucleotide exchange factors, activated by cAMP. There are two genes and Epac1 and Epac2 proteins are widely expressed throughout the brain (Kawasaki *et al.*, 1998), being Epac2 abundant in the cerebellum. To assess the role of Epac2 in cannabinoid-induced silencing we used a siRNA of Epac2 and the recently developed selective Epac2 inhibitor ESI-05. These experiments showed that Epac2 expression suppression and pharmacological inhibition both abolished the ability of 8pCpt to prevent and revert presynaptic silencing, indicating Epac2 implication in HU210 induced silencing.

Epac proteins mediate cAMP-dependent enhancement of synaptic transmission (Gekel and Neher 2008), as well as the  $\beta$ -AR-dependent potentiation of glutamate release (Ferrero *et al.*, 2013). To determine whether PLC signals downstream of Epac2 we used the PLC inhibitor U-73122. We observed that U-73122 fully abolished the ability of 8pCpt to prevent HU210 induced silencing, consistent with PLC involvement in presynaptic silencing.

Finally we have found that cannabinoid-induced silencing is related to low RIM1 $\alpha$  and high CB1R levels. To further explore RIM1 $\alpha$  role in silencing we performed experiments in cerebellar granule cells from wild type, knock out and knock out rescue mice. The lack of RIM1 $\alpha$  increased the proportion of basally silent nerve terminals and HU210 further increased this proportion. Treatment with 8pCpt did not affect the high level of basally silent synaptic boutons in RIM1 $\alpha$  KO cells, indicating that Epac2 proteins act upstream of RIM1 $\alpha$ .

## **I INTRODUCCIÓN**



## I INTRODUCCIÓN

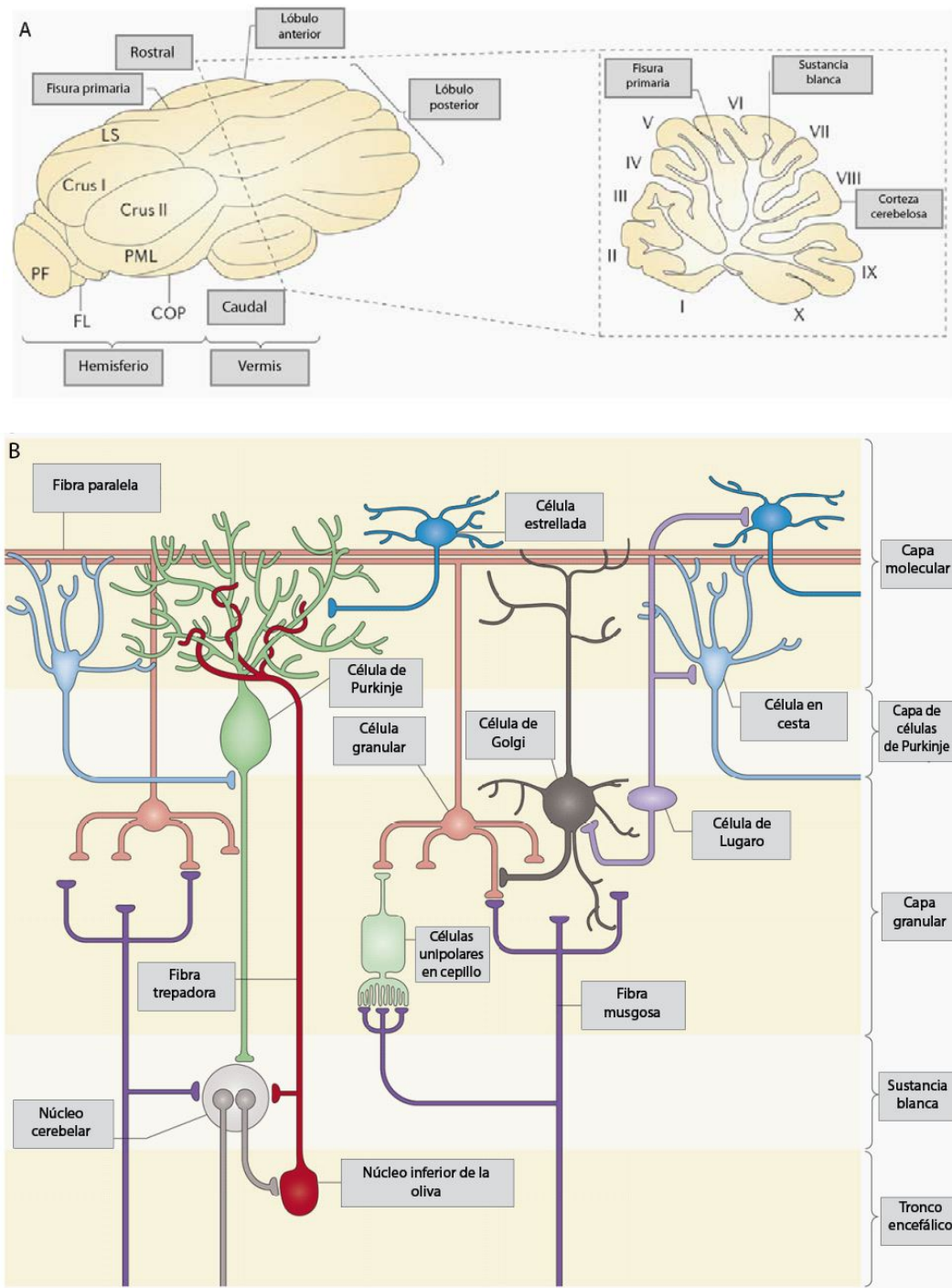
### 1. El cerebelo

El nombre de cerebelo proviene del latín y significa cerebro pequeño, ya que constituye sólo el 10% del volumen total del cerebro. Sin embargo, el cerebelo contiene más de la mitad de todas las neuronas cerebrales. La estructura del cerebelo está organizada de una forma muy regular con las neuronas agrupadas en unidades repetitivas representando cada una un módulo de circuito básico (Kandel *et al.*, 2000). El cerebelo funciona como un centro que ajusta o refina el movimiento, evaluando las discrepancias o diferencias entre la intención y la acción. Por un lado, recibe información descendente de la orden emitida por la corteza motora y por otro lado recibe información ascendente propioceptiva. Así pues, el cerebelo compara la intención de movimiento con el movimiento que se está realizando. El cerebelo no sólo participa en la regulación de las funciones motoras, posturales o de equilibrio, además modula funciones sensoriales o cognitivas en base a su conexión con regiones corticales implicadas en el aprendizaje, la percepción sensorial y las emociones (D'Angelo y Casali 2012).

#### 1.1. Estructura y función

El cerebelo ocupa la mayor parte de la fosa craneal posterior y está constituido por la sustancia gris externa o corteza cerebelosa, la sustancia blanca en la parte interna que contiene los tractos aferentes y eferentes, y tres pares de núcleos profundos: fastigial, interpuesto (constituido a su vez por los núcleos globosos y emboliforme) y dentado (Kandel *et al.*, 2000; Jacobson y Marcus 2008). El cerebelo está conectado al tronco encefálico mediante tres pares de tractos simétricos o pedúnculos cerebelosos: inferior, medio y superior. Por el pedúnculo cerebeloso inferior trascurren mayoritariamente aferencias ascendentes homolaterales de información propioceptiva (tracto espino-cerebeloso e información desde el núcleo inferior de la oliva). El pedúnculo cerebeloso medio representa la entrada de aferencias cortico-pontino-cerebelares con información motora de la corteza. El pedúnculo cerebelar superior contiene la mayoría de proyecciones eferentes ascendentes.

## INTRODUCCIÓN



**Figura I-1.** Estructura del cerebelo. A) Vista dorso-posterior de cerebelo de rata que muestra sus principales subdivisiones anatómicas. Se ve la organización bilateral y la línea media (línea discontinua) que separa el vermis en dos mitades con un hemisferio a cada lado. Corte sagital medial con la organización en lóbulos del cerebelo. B) Citoarquitectura básica del cerebelo. Se observan las diferentes capas y las células características de cada una de ellas, así como las principales vías eferentes y aferentes. Modificado de (Cerninara *et al.*, 2015).

La estructura del cerebelo es relativamente sencilla, comprendiendo 3 capas: la molecular, la de las células de Purkinje y la de las células granulares que en conjunto alojan 5 tipos principales de neuronas (Figura I-1). Las neuronas inhibitorias son las

células estrelladas, las células en cesta, las células de Purkinje y las neuronas de Golgi, mientras que las células granulares constituyen las neuronas excitadoras.

La capa más externa o *capa molecular* contiene los somas de dos tipos de interneuronas inhibitorias: las células estrelladas y las células en cesta, que se encuentran rodeadas por los axones excitadores de las células granulares y las dendritas de las células inhibitorias de Purkinje, cuyos somas se encuentran en la capa más interior. Los axones de las células granulares en esta capa se disponen de forma paralela al eje de las circunvoluciones y por ello se denominan fibras paralelas. Las dendritas de las neuronas de Purkinje se sitúan de manera perpendicular a estos axones (Kandel *et al.*, 2000). En este trabajo se ha utilizado un cultivo de células granulares que constituye el elemento presináptico de la sinapsis que se establece entre las fibras paralelas y las dendritas de las células de Purkinje.

Debajo de la capa molecular se encuentra la *capa de las células de Purkinje*, que contiene los somas de estas neuronas. Las células de Purkinje tienen somas relativamente grandes y una arborización dendrítica robusta que penetra en la capa molecular. Sus axones proyectan en la materia blanca subyacente hasta los núcleos cerebelares o vestibulares profundos, representando la salida de información de la corteza cerebelosa. Esta salida es completamente inhibitoria, por lo tanto mediada por el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA).

La capa más interna o *capa granular* contiene un alto número de somas de las células granulares y algunas células de Golgi. Las neuronas granulares son las neuronas de menor tamaño ( $<10\mu\text{m}$ ) a la vez que las más numerosas en el cerebro (alrededor de  $10^{11}$  células). Las fibras trepadoras, que son la mayoría de las aferencias del cerebelo, terminan en esta capa. Los terminales de las fibras trepadoras contactan con las dendritas de las células granulares y las neuronas de Golgi en estructuras denominadas glomérulos cerebelosos (Ramón y Cajal 1899; Palkovits *et al.*, 1971; Ito 1984).

### 1.2. Vías de señalización

El cerebelo recibe dos tipos principales de aferencias las fibras musgosas y las fibras trepadoras (Figura I-1) (Kandel *et al.*, 2000). Las primeras tienen su origen en núcleos de la médula espinal y del tronco encefálico y llevan información sensorial de la periferia, así como de la corteza cerebral. Forman sinapsis excitadoras con las dendritas de las células granulares en la misma capa granular. Los axones de las neuronas granulares atraviesan la capa de las células de Purkinje y la capa molecular hasta establecer sinapsis con las dendritas de dichas células en el mismo plano transversal. Las fibras trepadoras se originan en el núcleo inferior de la oliva y llevan información somatosensorial, visual o cortical. Los axones de estas neuronas envuelven los somas de las células de Purkinje y establecen numerosas sinapsis con las dendritas de dichas células a nivel de la capa molecular. Cada neurona de Purkinje

recibe información de una única fibra trepadora, mientras que cada fibra trepadora contacta con hasta 10 células de Purkinje. Así, la entrada de la información excitadora en el cerebelo activa tanto a las neuronas de los núcleos cerebelares profundos como a las neuronas granulares. Estas a su vez excitan a las células de Purkinje, cuya función es inhibir a las neuronas de los núcleos cerebelares profundos. De esta manera se lleva a cabo un refinamiento de la información eferente sobre las neuronas de los núcleos cerebelosos (Hashimoto y Hibi 2012). Se cree que el núcleo inferior de la oliva puede ser activado cuando se lleva a cabo una acción errónea, activando posteriormente por medio de las fibras trepadoras a las neuronas de Purkinje correspondientes (D'Angelo y Casali 2012). Esto tendría como resultado final la inhibición de los núcleos profundos del cerebelo, por lo que se podría decir que el núcleo olivar inferior funciona como detector de errores.

La actividad de las células de Purkinje es inhibida por las interneuronas estrelladas, en cesta y de Golgi. Los axones de las células estrelladas contactan con las dendritas de las células de Purkinje que las rodean, mientras que los axones largos de las células en cesta transcurren de forma perpendicular a las fibras paralelas y forman sinapsis con las de Purkinje de forma anterior y posterior al haz de fibras paralelas.

## **2. La sinapsis glutamatérgica**

### **2.1. La sinapsis**

La función cerebral depende de la comunicación rápida que se establece entre los miles de millones de neuronas que constituyen el cerebro. Esta comunicación interneuronal se establece en uniones altamente especializadas denominadas sinapsis. Se conocen dos formas de comunicación entre neuronas, las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas.

Las *sinapsis eléctricas* transmiten corrientes iónicas de forma directa, ya que existe una comunicación entre los citoplasmas de ambas células por medio de uniones intercelulares o uniones de hendidura (en inglés *gap junction*) que permiten el paso de los iones (Kandel *et al.*, 2000; Tresguerres *et al.*, 2005). En general la comunicación en las sinapsis eléctricas es bidireccional. Debido a esta conexión, la despolarización entre ambas células se transmite de forma prácticamente instantánea, sin retraso sináptico (Cardinali 2007). Así, las sinapsis eléctricas se caracterizan por su alta velocidad de transmisión de la señal y por poder disparar sus potenciales de acción de forma sincronizada. En la mayoría de casos estas sinapsis se localizan en circuitos neuronales donde la velocidad o la sincronización son de especial importancia. Las sinapsis eléctricas suelen encontrarse en organismos considerados menos evolucionados,

aunque también se han descrito en algunas regiones y en redes de interneuronas GABAérgicas del cerebro de mamíferos.

En las *sinapsis químicas* la información se transmite de forma unidireccional e indirecta, por medio de un mensajero químico o neurotransmisor. En este tipo de sinapsis existe una discontinuidad espacial de unos 30nm (Cowan *et al.*, 2001) entre las neuronas pre- y postsináptica, denominada hendidura sináptica, donde se libera el neurotransmisor. Tras la llegada del potencial de acción a la neurona presináptica, debido al cambio de polaridad de la membrana, se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que dispara la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la liberación del neurotransmisor. Por tanto, la señal eléctrica que llega a la neurona presináptica se convierte en una señal química que es transmitida a la neurona postsináptica. En este proceso además se da una amplificación de la señal, dado que un potencial de acción puede provocar la liberación de múltiples vesículas sinápticas, que contienen unas 4000 moléculas de neurotransmisor, en el caso de las sinapsis glutamatérgicas, que a su vez pueden activar múltiples receptores postsinápticos. El neurotransmisor activa receptores específicos en la neurona postsináptica, produciendo una despolarización de la misma en el caso de un neurotransmisor excitador o una hiperpolarización si el neurotransmisor es inhibitorio. La neurona postsináptica integra estas señales en una base temporal y espacial y si la despolarización resultante alcanza un determinado umbral la neurona postsináptica dispara un potencial de acción que se propaga por la red de neuronas (Sudhof 2004). Para terminar la transmisión sináptica los neurotransmisores son inactivados por degradación enzimática o por recaptación por los transportadores de las células gliales y de las neuronas pre- y postsináptica. En las sinapsis químicas existe por tanto, un retraso sináptico entre la llegada de un potencial de acción a la neurona presináptica y la detección de la señal eléctrica en la neurona postsináptica que puede oscilar ampliamente entre sinapsis pero que en las sinapsis glutamatérgicas es alrededor de un milisegundo. Las sinapsis químicas son altamente modulables tanto por mecanismos presinápticos que regulan la probabilidad de liberación de neurotransmisor, como por mecanismos postsinápticos que modifican el número de receptores en la superficie de la neurona (Koester y Johnston 2005).



## 2.2. La sinapsis glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos y las sinapsis glutamatérgicas participan en importantes procesos fisiológicos de transmisión y plasticidad sinápticas, memoria y aprendizaje, migración celular, etc. La desregulación en la transmisión glutamatérgica se ha relacionado con diversas patologías como la isquemia cerebral, enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, así como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El cerebro contiene una alta concentración de glutamato que en el citoplasma neuronal es de 5-10mM (Ottersen *et al.*, 1990; Ottersen *et al.*, 1992; Danbolt 2001) siendo aún mayor en los terminales axónicos (Ottersen 1989). La enzima de los botones sinápticos glutaminasa es responsable de la síntesis de la mayor parte del glutamato. Alrededor de un 40% del glutamato es sintetizado a partir de la glutamina, mediante la hidrólisis de su cadena lateral por la glutaminasa presente en las mitocondrias de los botones sinápticos. Los astrocitos que rodean las sinapsis son los que proporcionan la glutamina necesaria para esta reacción por conversión del glutamato sináptico captado por los transportadores gliales de este aminoácido en glutamina por la enzima glutamina sintetasa (Martínez-Hernández *et al.*, 1977; Norenberg 1979; Derouiche y Frotscher 1991; Eid *et al.*, 2013). La otra fuente de glutamato es el  $\alpha$ -cetoglutarato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante la transaminación del mismo. El glutamato citoplasmático se concentra aún más dentro de las vesículas sinápticas (hasta 100mM) mediante transportadores vesiculares específicos de glutamato o vGluts (del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*). Estos transportadores acumulan glutamato gracias al gradiente electroquímico de protones generado por la bomba de protones v-ATPasa utilizando sobre todo el componente eléctrico del mismo (Blakely y Edwards 2012). Existen 3 transportadores específicos de glutamato: vGlut1 (Takamori *et al.*, 2000), vGlut2 (Aihara *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2001) y vGlut3 (Fremeau *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2002). Una vez liberado en la hendidura sináptica por exocitosis tras la llegada de un potencial de acción el glutamato activa receptores situados en la membrana postsináptica y presináptica.

Existen dos tipos receptores de glutamato: los receptores ionotrópicos (iGluR) y los receptores metabotrópicos (mGluR). Los receptores *ionotrópicos*, son canales iónicos multiméricos, activados por la unión de glutamato. Cuando el glutamato se une a los dominios extracelulares de las subunidades iGluR el receptor experimenta un cambio conformacional para permitir el flujo de cationes a través de la membrana, lo cual normalmente causa la despolarización de la neurona postsináptica. Son de tres tipos (Hollmann y Heinemann 1994), receptores sensibles: a ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), a  $\alpha$ -amino-hidroxi-5metilisoxazolid-4-propionato (Valtorta *et al.*, ) y a kainato. La localización de los receptores NMDA y AMPA es predominantemente postsináptica, mientras que los de kainato se encuentran tanto a nivel pre-, como postsináptico

(Lerma 2003). Los receptores NMDA activan canales permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , además de a  $\text{Ca}^{2+}$ . Los receptores NMDA presentan varias propiedades, como por ejemplo, la necesidad de glicina como cofactor para la apertura del canal (Johnson y Ascher 1987), aunque en condiciones normales la concentración de glicina en el medio extracelular podría ser suficiente para la actividad del receptor. Otra característica fundamental es que la apertura del canal también depende del potencial de membrana, ya que en condiciones de reposo (potencial de membrana de  $-65\text{mV}$ ) el  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular bloquea el canal impidiendo el flujo de iones (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984; Nicoll 2003; Citri y Malenka 2008). Así, sólo cuando la membrana se despolariza tras la activación de los receptores AMPA o de kainato, el  $\text{Mg}^{2+}$  es expulsado permitiendo el flujo iónico. De este modo los receptores NMDA actúan como detectores de coincidencia de la despolarización de la membrana y la liberación de glutamato (Citri y Malenka 2008). Por tanto, la función de los receptores AMPA es producir una rápida despolarización de la célula postsináptica, mientras que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por los receptores NMDA están implicadas en fenómenos de plasticidad sináptica (Citri y Malenka 2008).

Los receptores de glutamato sensibles a kainato modulan la actividad neuronal por medio de la regulación de la conductancia iónica y de la modulación de la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores (Pinheiro y Mulle 2006). La inhibición de la liberación de GABA es por un mecanismo de señalización metabotrópico que implica a proteínas G (Rodríguez-Moreno y Lerma 1998; Lerma 2003; Rozas *et al.*, 2003). Los receptores NMDA generan corrientes más prolongadas que los receptores AMPA o kainato, permitiendo así una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que inicia cascadas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que dan lugar a cambios en la expresión genética y en la fuerza sináptica, que se manifiesta en fenómenos de plasticidad que son la base del aprendizaje y memoria (Monaghan *et al.*, 1989; Whitlock *et al.*, 2006; Citri y Malenka 2008; Kerchner y Nicoll 2008).

Los receptores *metabotrópicos* son receptores con 7 dominios transmembrana que están acoplados a proteínas G heterotriméricas. Estos realizan sus funciones por medio de la modulación de la producción de segundos mensajeros y de la regulación de la fosforilación de proteínas, o por modulación directa de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{K}^+$ . En los mamíferos hay tres grupos de receptores metabotrópicos de glutamato: I, II y III donde se integran los 8 receptores mGlu clonados. Los receptores mGlu del tipo I se localizan principalmente a nivel postsináptico y activan a la fosfolipasa C (PLC), mientras que los del tipo II, que se localizan pre- y postsinápticamente, y los del grupo III, que se localizan preferentemente en la presinápsis, inhiben la adenilato ciclasa modificando los niveles de AMPc de la célula (Conn y Pin 1997; Niswender y Conn 2010).

Los transportadores de glutamato son los encargados de terminar la acción sináptica de este neurotransmisor y de mantener, por tanto, los niveles extracelulares de este aminoácido por debajo de niveles que puedan ser tóxicos para las neuronas. (Choi 1992; Danbolt 2001). Los transportadores de glutamato promueven la entrada a la célula de un glutamato,  $3\text{Na}^+$  y  $1\text{H}^+$ , mientras que sale un  $\text{K}^+$ , son pues electrogénicos y se expresan mayoritariamente en astrocitos, aunque también lo hacen en neuronas. Se han clonado 5 transportadores de glutamato denominados EAAT1-5 (del inglés *Excitatory Aminoacid Transporters*). Los EAAT1-2 se expresan en la glía (Regan *et al.*, 2007) aunque EAAT2 se localizan también en terminales presinápticos. Los transportadores EAAT3-5 se expresan en neuronas postsinápticas, si bien la expresión de los EAAT4 y 5 se limita a las células de Purkinje del cerebelo y la retina, respectivamente (Gegelashvili y Schousboe 1997; Seal y Amara 1999).

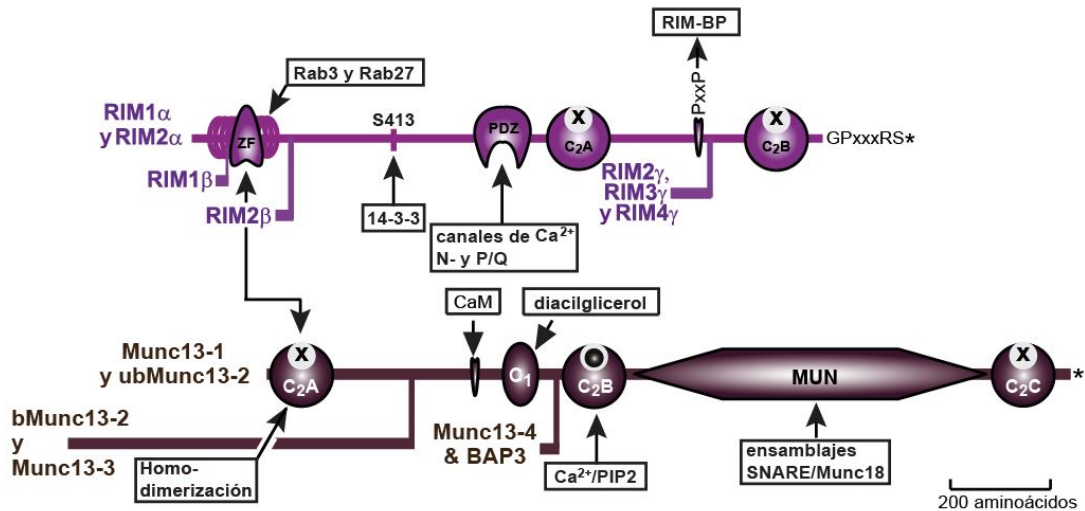
### 2.3. El terminal sináptico

#### 2.3.1. La zona activa

El término zona activa hace referencia a la región de la membrana presináptica que está especializada en la fusión de las vesículas para la liberación del neurotransmisor de manera calcio-dependiente (Couteaux y Pecot-Dechavassine 1970). Está compuesta por una matriz de proteínas no solubles en detergentes, que hace que esta región sea ligeramente más electrodensa. En el SNC de vertebrados las zonas activas tienen forma discoidal con un diámetro de 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  (Südhof 2012). Las zonas activas tienen varias funciones en relación con la liberación del neurotransmisor. En primer lugar albergan la maquinaria exocitótica, que permite la colocación de las vesículas sinápticas (SVs) en las proximidades de la membrana presináptica, la preparación de las mismas para la fusión y últimamente la fusión y exocitosis de neurotransmisor. Además, ayudan a reclutar los canales de calcio dependientes de voltaje próximos a las VSs lo que permite el acoplamiento entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis. El núcleo de la zona activa se compone de 5 proteínas principales altamente conservadas a nivel evolutivo (Südhof 2012): RIM, Munc13, RIM-BP,  $\alpha$ -liprinas y ELKS/CAST. Además de las proteínas antes mencionadas, Piccolo y Bassoon conformarían la citomatrix de la zona activa (tom Dieck *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Limbach *et al.*, 2011).

Las RIM (del inglés, *Rab3 Interacting Molecules*, moléculas de interacción con Rab3) son proteínas multiméricas con 5 dominios bien diferenciados (Figura I-2): un dominio N-terminal de tipo dedo de  $\text{Zn}^{2+}$  que incluye una secuencia de unión a Rab3, un dominio PDZ central, dos dominios C-terminales de tipo C2, C2A y C2B que no unen

calcio ni fosfolípidos y que flanquean una secuencia de interacción SH3 rica en prolina (PxxP) altamente conservada (Wang y Sudhof 2003). En vertebrados existen 4 genes, de los cuales únicamente RIM1 $\alpha$  and RIM2 $\alpha$  contienen todos los dominios antes mencionados. RIM1 $\beta$  carece de la hélice  $\alpha$  del dominio N-terminal (Kaeser *et al.*, 2008), mientras que RIM2 $\beta$  carece completamente de este dominio y RIM2 $\gamma$  contiene únicamente la secuencia C2B precedida por una secuencia corta (Wang *et al.*, 2000; Wang y Sudhof 2003). Por último, los genes RIM3 y RIM4 codifican sólo las isoformas RIM3 $\gamma$  y RIM4 $\gamma$ , respectivamente, que tienen los mismos dominios que RIM2 $\gamma$ .



**Figura I-2.** Dominios estructurales de las proteínas presinápticas RIM y Munc13. Se observan los dominios principales de cada una de ellas y los elementos con los cuales interaccionan. Modificado de (Südhof 2012).

Las proteínas RIM son un componente central de la presinapsis ya que interaccionan directa o indirectamente con la mayoría de las proteínas de la zona activa. Mediante la estructura de dedo de  $\text{Zn}^{2+}$  del dominio N-terminal las proteínas RIM se unen a la región C2A de Munc13-1 y ubMunc13-2, mientras que las hélices  $\alpha$  que rodean al mismo se unen a Rab3 y Rab27 de manera GTP-dependiente (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000). Únicamente las isoformas largas, es decir RIM1 $\alpha$  y RIM2 $\alpha$ , son capaces de unir tanto Rab3 y Rab27, como Munc13-1. Este complejo heterotrimérico entre RIM, Munc13 y Rab3 o Rab27 es el que podría acercar las vesículas a la membrana plasmática (Dulubova *et al.*, 2005) siendo así responsable del proceso de amarre o anclaje de las mismas (Gracheva *et al.*, 2008; Kaeser *et al.*, 2011). RIM por medio de este dominio tipo dedo de  $\text{Zn}^{2+}$  interacciona con el dominio C2A de Munc13 compitiendo con la formación del homodímero autoinhibitorio de Munc13 (Betz *et al.*, 2001; Dulubova *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2011). Esta interacción ayuda probablemente a la localización de Munc13 en la membrana plasmática, ya que los ratones carentes de las isoformas de RIM que tienen el dominio dedo de  $\text{Zn}^{2+}$  muestran un incremento en la solubilidad de Munc13 (Schoch *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011). Por tanto, RIM ayuda a formar un

heterodímero RIM/Munc13 activo que permite la función de Munc13 (Lu *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2011), esto es promover la conformación abierta de syntaxina y por tanto la formación del complejo SNARE (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2011).

Las proteínas RIM ayudan a localizar los canales de calcio voltaje dependientes en la zona activa (Kaeser *et al.*, 2011) mediante interacciones directas e indirectas. El dominio C2B carboxilo terminal de las isoformas largas y cortas de RIM interacciona con la subunidad  $\beta 4$  presente en todos los tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kiyonaka *et al.*, 2007; Uriu *et al.*, 2010). Por su dominio PDZ central RIM interacciona con secuencias citoplasmáticas del carboxilo terminal de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo P/Q y N aunque no L y T (Kaeser *et al.*, 2011). En este sentido se ha observado que las sinapsis con RIM carente del dominio PDZ contienen menos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos, tienen un mayor requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y muestran una desincronización entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis (Kaeser *et al.*, 2011). Mediante sus dominios C2A y C2B RIM interacciona con la subunidad  $\alpha 1B$  de los canales del tipo N (Coppola *et al.*, 2001). Además de la unión directa con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , las proteínas RIM también se unen a los mismos por medio de la proteína RIM-BP (del inglés *RIM-Binding Protein*, proteína de unión a RIM), por la secuencia rica en prolina, ayudando a localizar a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona activa (Figura I-3). Las proteínas RIM también interaccionan por sus dominios PDZ con otras proteínas de la zona activa como las proteínas ELKS/CAST (Lu *et al.*, 2005).

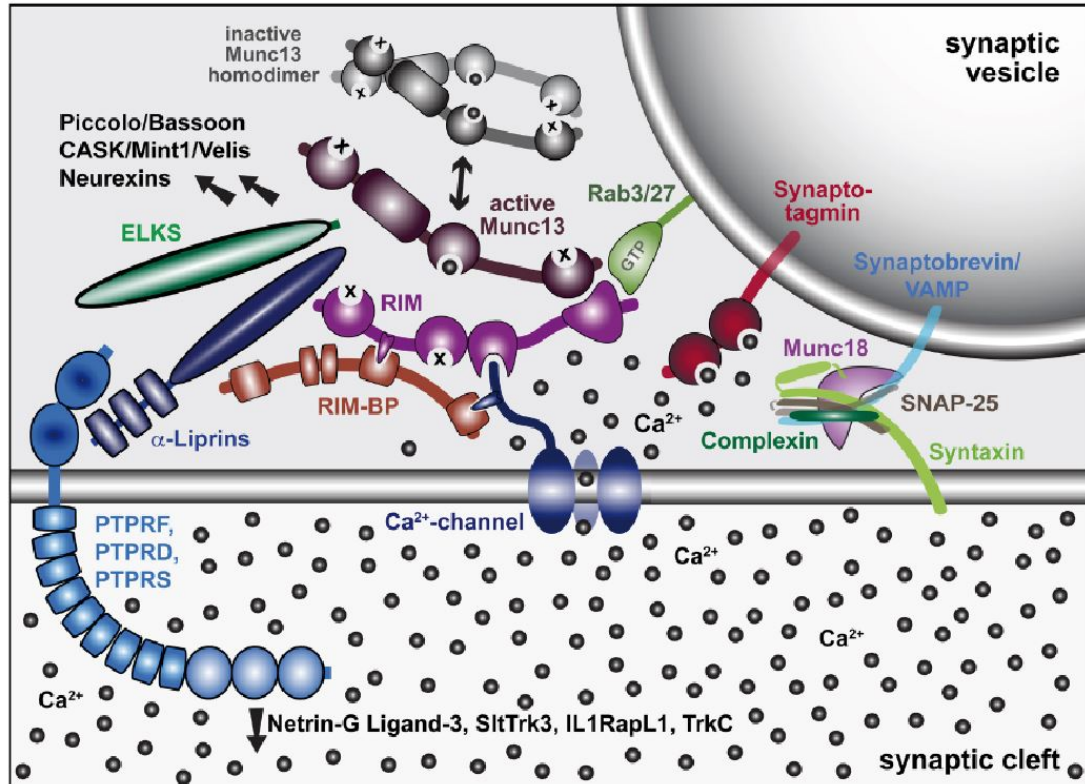
Las proteínas RIM tienen un papel muy importante en la liberación basal de neurotransmisores. En *C. elegans* la ausencia de la proteína UNC10/RIM reduce la frecuencia de los mEPSCs así como la respuesta inducida por despolarización (Koushika *et al.*, 2001). En mamíferos, se ha descrito que el ratón KO para RIM1 $\alpha$  muestra una disminución del RRP y de la probabilidad de liberación (Kaeser *et al.*, 2008). El doble KO para RIM1 $\alpha$  y RIM2 $\alpha$  muestra defectos en el RRP, en la frecuencia de los mEPSCs, en la amplitud de las respuestas inducidas, y una desincronización entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis (Kaeser *et al.*, 2011). La importancia de las funciones que ejercen las proteínas RIM, se pone de manifiesto en la letalidad del doble KO de RIM1 $\alpha$  y RIM2 $\alpha$  (Schoch *et al.*, 2006). Además de su papel en la liberación basal de neurotransmisores, las proteínas RIM se han relacionado con fenómenos de plasticidad a corto y largo plazo dependientes de AMPc (Kaeser y Sudhof 2005; Mittelstaedt *et al.*, 2010). El ratón KO para RIM1 $\alpha$  muestra deficiencias en fenómenos de STP (del inglés *Short-Term Potentiation*) tanto en rodajas de hipocampo (Schoch *et al.*, 2002) como en cultivos autópticos de neuronas de hipocampo (Calakos *et al.*, 2004). La proteína RIM1 $\alpha$  es importante para la LTP dependiente de AMPc de las fibras musgosas del hipocampo y del cerebelo (Castillo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005). RIM1 $\alpha$  también es importante en los procesos de plasticidad en sinapsis inhibitoras (Kaeser *et al.*, 2008). Se ha demostrado que el receptor CB1 presente en el hipocampo inhibe la formación de

AMPC, evitando la LTP dependiente de RIM y dando lugar a LTD (Chevaleyre *et al.*, 2007).

Las proteínas de la zona activa Munc13 (del inglés, *Mammalian homologue of UNCoordinatedphenotype13* de *C. elegans*) son esenciales para la preparación de las vesículas sinápticas para la fusión (Augustin *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2002) que además median mecanismos de plasticidad dependientes de diacilglicerol (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002). Las proteínas Munc-13 están codificadas por 4 genes: Munc13-1, Munc13-2, Munc13-1 y Munc13-4. Estos genes codifican las proteínas Munc13-1; las variantes de proceso alternativo bMunc13-2 y ubMunc13-2, isoformas asociadas al cerebro y ubicua, respectivamente; Munc13-3 y Munc13-4, que se expresa solamente en células secretoras periféricas (Brose *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 2000). La isoforma Munc13-1 se expresa en todo el cerebro con mayores niveles de expresión en bulbo olfatorio, estriado, corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Munc13-2 abunda en bulbo olfatorio, corteza cerebral, e hipocampo, mientras que Munc13-3 se localiza en cerebelo y tronco encefálico (Augustin *et al.*, 1999). Las proteínas Munc13 se asocian a membranas por unión del diacilglicerol y translocación a la misma (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002). Además Munc13 interacciona con fosfolípidos de la membrana (Shin *et al.*, 2010). La interacción con RIM lleva a la proteína a la localización en la membrana ya que los KO de las distintas proteínas RIM aumentan la solubilidad de Munc13 (Schoch *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011).

Estructuralmente, la región N-terminal de Munc13-1 y ubMunc13-2 contiene un dominio C2A que no une  $\text{Ca}^{2+}$  y una secuencia larga de función desconocida, seguida por una secuencia central de unión a calmodulina y un dominio C1 que une diacilglicerol (Figura I-2). Por lo contrario, las isoformas bMunc13-2 y Munc13-3 tienen una región N-terminal diferente y de mayor longitud situada corriente arriba del dominio C1, ya que carecen de los dominios de unión de Ca/CaM y del dominio C2A (Sudhof 2012). La isoforma corta Munc13-4 carece de todos los dominios situados corriente arriba de la región C2B. En todas las isoformas el dominio C2B, que une tanto  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos como PIP y PIP<sub>2</sub>, es seguido por una región larga denominada MUN y un dominio C2C calcio-independiente de la región C-terminal. El dominio MUN podría favorecer la conformación abierta de la proteína syntaxina-1 (Gerber *et al.*, 2008), permitiendo la exposición del dominio SNARE y el inicio del ensamblaje del complejo (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2011) por interacción con los dominios SNARE de las otras proteínas del complejo, sinaptobrevina y SNAP25. Las proteínas Munc13 interaccionan con otras proteínas de la zona activa. El dominio C2B de la región N-terminal permite la homodimerización de la proteína lo que resulta en un estado inactivo (Dulubova *et al.*, 2005) que pierde su capacidad para preparar las vesículas para la fusión (Deng *et al.*, 2011). La unión con RIM da lugar a la ruptura del homodímero autoinhibitorio de Munc13 permitiendo la formación de un

heterodímero activo (Figura I-3). Además el dominio MUN es controlado por las regiones centrales de señalización que comprenden la región de unión a calmodulina y los dominios C1 y C2B, y que son esenciales en la regulación de la liberación (Rhee *et al.*, 2002; Junge *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2010).



**Figura I-3.** Representación esquemática del acercamiento de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática por medio de interacciones entre las proteínas de la zona activa. Modificado de Südhof, 2012.

La RIM-BP (del inglés *RIM-Binding Protein*) son proteínas multidominio que en vertebrados están codificadas por 3 genes (Wang *et al.*, 2000; Mittelstaedt y Schoch 2007). Todas las RIM-BP contienen tres dominios SH3 (uno central y dos en la región C-terminal) y tres dominios fibronectina III centrales (Wang *et al.*, 2000; Mittelstaedt y Schoch 2007). Se ha demostrado que estas proteínas juegan un papel fundamental en la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N y PQ a la zona activa (Kaesler *et al.*, 2011). Esta función depende de la unión de la RIM-BP a RIM y a los canales de calcio simultáneamente (Figura I-3). Experimentos en *Drosophila* también han demostrado que la organización de la zona activa se altera en la ausencia de las RIM-BP, lo cual indica que podrían tener funciones adicionales a la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a la zona activa (Liu *et al.*, 2011).

Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -liprinas son proteínas relacionadas estructuralmente y compuestas por un dominio hélice-hélice en el extremo N-terminal, y tres dominios SAM en la parte C-terminal (Serra-Pages *et al.*, 1995). La región N-terminal de las  $\alpha$ -liprinas se une a sí misma formando homodímeros (Taru y Jin 2011), al dominio C2B de RIM (Schoch *et al.*, 2002) y a las proteínas ELKS (Ko *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2006) entre otras. Los

dominios SAM de la parte C-terminal se unen a  $\beta$ -liprinas formando heterodímeros (Serra-Pages *et al.*, 1995), a CASK (Olsen *et al.*, 2005) y a receptores fosfotirosina fosfatasas de tipo LAR (Serra-Pages *et al.*, 1995). Las  $\alpha$ -liprinas se relacionaron con la zona activa en estudios con *C. elegans* en los que la proteína había perdido su función. En estos estudios el tamaño de la zona activa parecía haber incrementado y la acumulación de vesículas en la zona activa estaba alterada (Zhen y Jin 1999; Dai *et al.*, 2006), hecho confirmado también en *Drosophila* (Kaufmann *et al.*, 2002). Aunque no hay estudios en vertebrados los datos de invertebrados indican que las  $\alpha$ -liprinas actuarían acoplando la adhesión sináptica al complejo RIM/Munc13/RIM-BP que localiza las vesículas y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a la zona activa (Sudhof 2012).

Las proteínas ELKS consisten en estructuras largas hélice-hélice aparentemente sin ninguna organización en dominios. El genoma de mamíferos contiene dos genes mientras que en *Drosophila* se ha encontrado una proteína homóloga denominada "Bruchpilot", que contiene un dominio N-terminal con una alta homología en la secuencia a ELKS y un dominio C-terminal extenso con estructuras hélice-hélice parecido a proteínas del citoesqueleto como la plectina (Wagh *et al.*, 2006). La presencia de las proteínas ELKS en la zona activa se descubrió por su interacción con el dominio PDZ de RIM (Wang *et al.*, 2002). El dominio C-terminal probablemente se une a dominios PDZ de otras proteínas como la sintenina-1 (Ko *et al.*, 2006). Las ELKS además interaccionan directamente con las  $\alpha$ -liprinas (Ko *et al.*, 2003). Algunos estudios en *C. elegans* y en ratones han mostrado que estas proteínas no son imprescindibles para la formación de las sinapsis y su funcionamiento en condiciones basales. Sin embargo, en *Drosophila* la carencia de *Bruchpilot* causa la pérdida de las barras T características de las sinapsis en *Drosophila* (Wagh *et al.*, 2006), y una reducción de la liberación de neurotransmisor de aproximadamente el 30% (Kittel *et al.*, 2006). Estos y otros estudios sugieren que *Bruchpilot* ejerce una doble función en la mosca de la fruta, una mediada por la región N-terminal parecida a la función conocida de las ELKS, y otra mediada por la región C-terminal homóloga a plectina que se relaciona con el reclutamiento de vesículas de forma análoga a Piccolo y Bassoon en mamíferos.

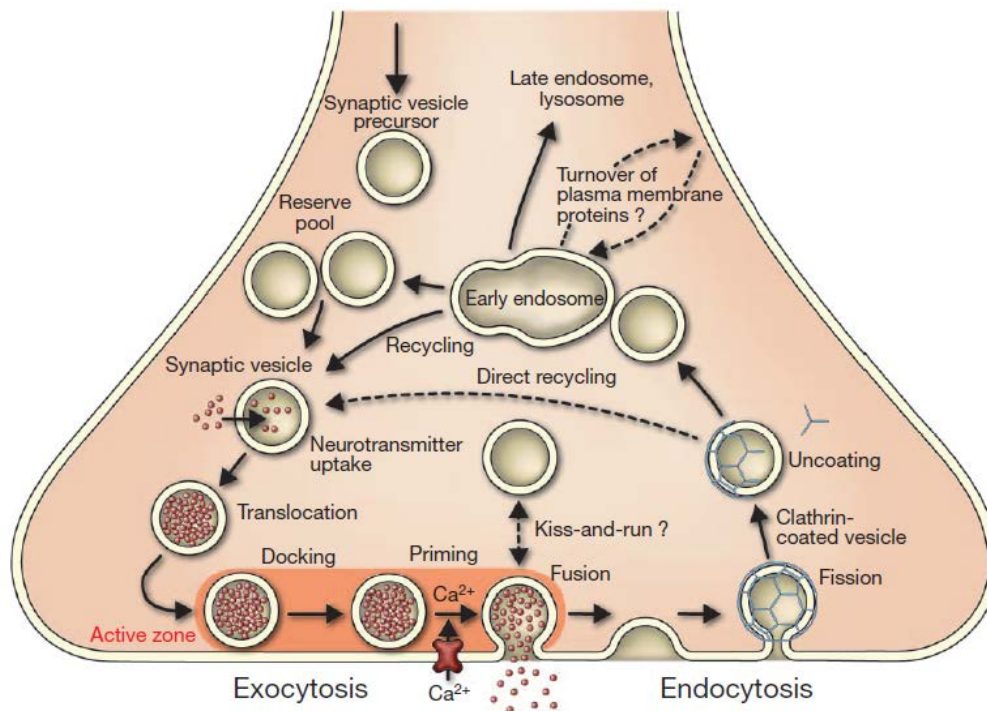
Piccolo/Aczonin y Bassoon son dos proteínas de la zona activa relacionadas estructuralmente, con tamaños de 530 y 420kDa, por lo que son las proteínas de mayor tamaño de la zona activa identificadas hasta el momento (Cases-Langhoff *et al.*, 1996; tom Dieck *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Fenster *et al.*, 2000). Estas proteínas constituyen la citomatriz de la zona activa y parecen extenderse hacia el interior del terminal presináptico debido a su gran tamaño. Las proteínas Piccolo y Bassoon son específicas de vertebrados y su principal función parece ser la de agrupar las vesículas sinápticas y dirigirlas hacia la zona activa (Hallermann *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2010). La mayoría de secuencias de Piccolo y Bassoon son homólogas. La región N-terminal forma dedos de  $\text{Zn}^{2+}$  seguidos por estructuras largas hélice-hélice sin una



delimitación clara entre dominios (tom Dieck *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Piccolo además contiene un dominio PDZ en el extremo C-terminal y dos dominios C2. Piccolo y Bassoon tienen sus extremos C terminales en las zonas medias y distales de la proyecciones electrodensas que aparecen en la microscopía electrónica de las zonas activas, mientras que el extremo N-terminal se extiende hacia el interior del citoplasma (Siksou *et al.*, 2009; Limbach *et al.*, 2011). La depleción parcial de Bassoon afecta a la supervivencia y a la liberación de neurotransmisor en ratones carentes de la misma (Altrock *et al.*, 2003), mientras que la falta de Piccolo no parece afectar estos procesos en cultivo de neuronas de hipocampo o en rodajas (Mukherjee *et al.*, 2010). Probablemente estas proteínas estén implicadas en el agrupamiento de vesículas sinápticas o “*clustering*” ya que las sinapsis que carecen parcialmente de ambas proteínas mostraban defectos en la agrupación de vesículas (Mukherjee *et al.*, 2010).

#### **2.4. El ciclo de las vesículas sinápticas**

El ciclo de las vesículas sinápticas comprende una serie de etapas de tráfico intracelular que comienza con la colocación de las vesículas sinápticas en las proximidades de la membrana en la zona activa, la adquisición de competencia para la exocitosis, su fusión con la membrana plasmática y la posterior fisión de la vesícula por endocitosis, seguido de la re-acidificación del interior vesicular y de la carga de la vesícula con neurotransmisor (Figura I-4). De este modo los botones sinápticos son capaces de llevar a cabo rondas repetidas de exocitosis tras la llegada de los potenciales de acción.



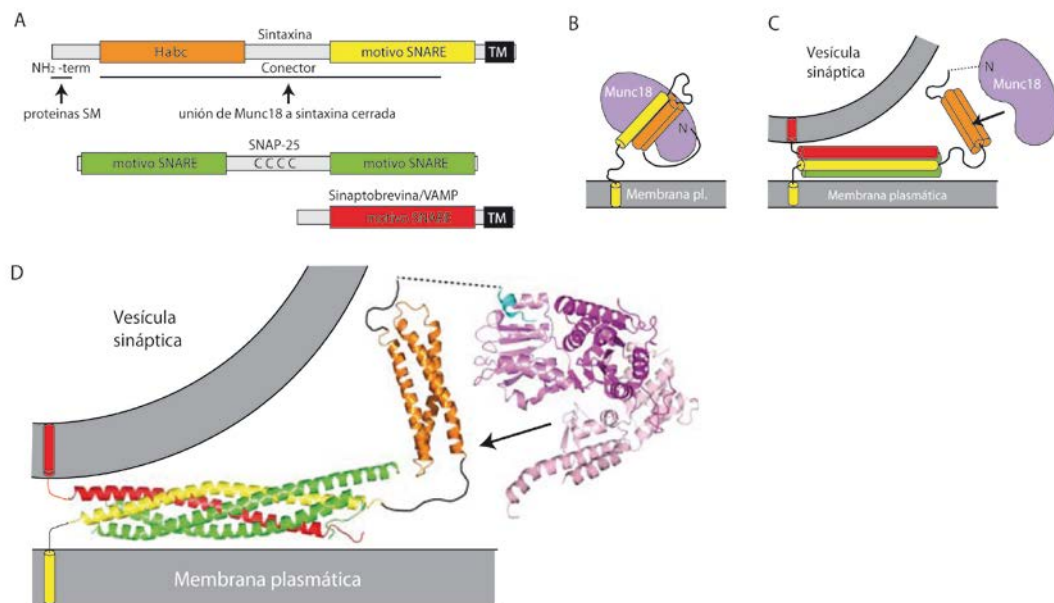
**Figura I-4.** Vías de exo- y endocitosis. El neurotransmisor entra en las vesículas sinápticas mediante transporte activo. Las vesículas son ancladas a la membrana de la zona activa, donde experimentan un proceso de maduración que las hace competentes para fusionarse con la membrana de manera calcio dependiente. Posterior a la apertura del poro las vesículas sufren un proceso de endocitosis y reciclaje, principalmente por medio de endocitosis mediada por clatrina o por la vía de kiss and run. Adaptado de (Jahn y Fasshauer 2012).

#### 2.4.1. Preparación de las vesículas

Antes de la fusión de la bicapa lipídica de las vesículas sinápticas con la bicapa lipídica de la membrana plasmática las vesículas experimentan un proceso de preparación para la liberación que implica por un lado, el acercamiento de la vesícula a la zona activa donde se generan los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que se conoce como anclaje o amarre a la membrana (del inglés *docking*) y por otro lado, la preparación de la vesícula para la fusión (del inglés *priming*) por un proceso que implica el ensamblaje del complejo SNARE (Sudhof 2012). El proceso de anclaje o amarre a la membrana tiene como elementos cruciales a las proteínas RIM, Munc13, Rab3/27 y Munc18 (Hata *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2008; Deak *et al.*, 2009). La ausencia de Munc13 y Munc18 causa defectos en la exocitosis (Verhage *et al.*, 2000; Varoqueaux *et al.*, 2002). Los ratones carentes de Rab3 tienen un déficit en el reclutamiento de vesículas sinápticas durante la estimulación (Leenders *et al.*, 2001). Munc18 al interactuar con la forma semicerrada de syntaxina 1 (Dulubova *et al.*, 1999; Deak *et al.*, 2009) promueve el inicio de la formación del complejo SNARE. Así la preparación de las vesículas empezaría con la unión GTP-dependiente de Rab3 a RIM y la formación del complejo heterotrimérico entre Rab3 y el heterodímero RIM/Munc13 previamente formado que ancla

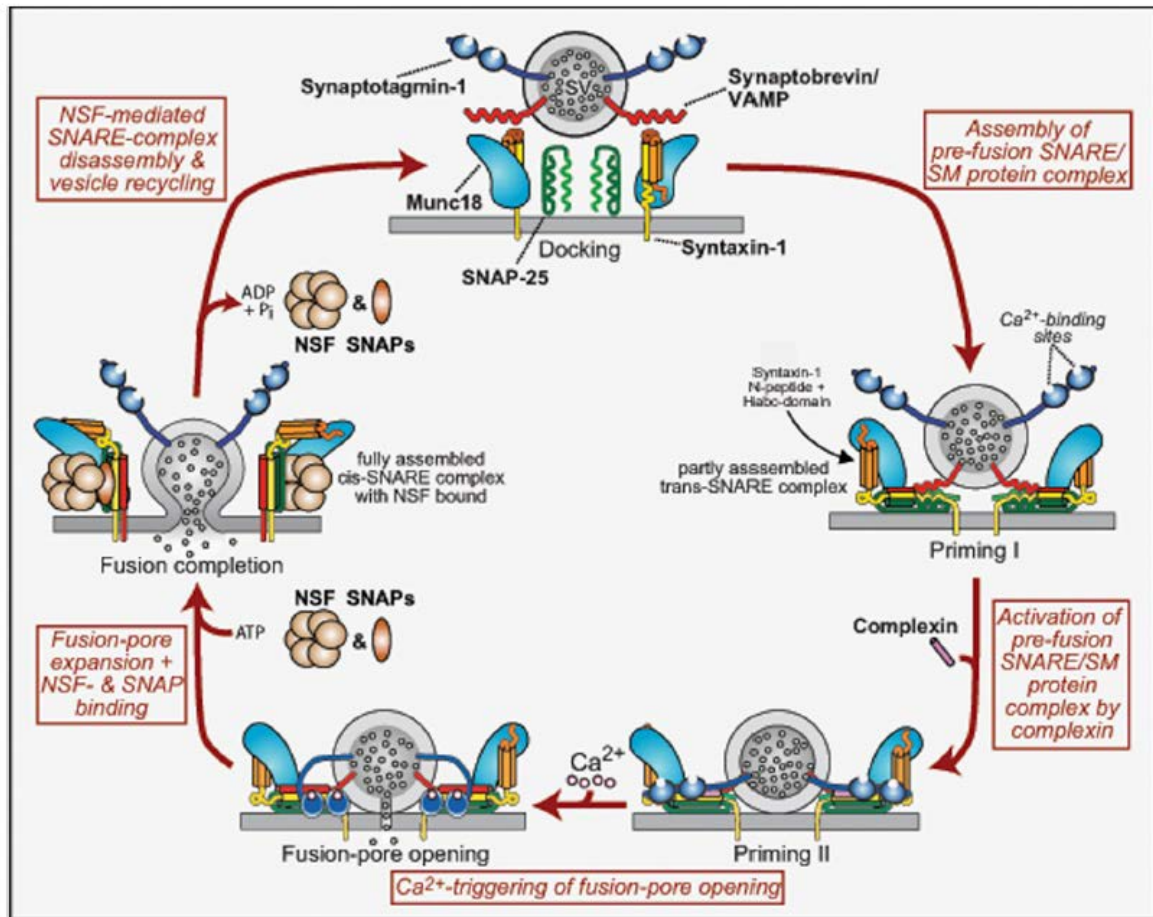
físicamente las vesículas sinápticas a la zona activa. Posteriormente la activación de Munc13 por calcio y DAG transloca la proteína a la membrana y aproxima la vesícula a su sitio final de fusión. En último lugar la proteína Munc18 inicia la formación del complejo SNARE, adquiriendo de este modo la vesícula plena competencia exocitótica.

Las proteínas SNARE (*del inglés* SNAP REceptors) forman parte de una superfamilia de proteínas que han sido altamente conservadas durante la evolución. Participan en múltiples vías de tráfico en el interior de la célula. En el terminal sináptico la formación del complejo SNARE es fundamental para el inicio de la fusión de la vesícula sináptica con la membrana plasmática. Su principal característica es la posesión de una estructura helicoidal denominado dominio SNARE (Fasshauer *et al.*, 1998). Son tres las proteínas que participan en la formación del complejo SNARE: la proteína integral de la vesícula sináptica sinaptobrevina o VAMP (*del inglés, Vesicle Associated Membrane Protein*), la proteína integral de la membrana presináptica syntaxina-1 y la proteína asociada a membrana SNAP-25. El complejo SNARE formado entre las proteínas de membrana y vesiculares representa un nexo físico entre las ambas membranas posibilitando el proceso de fusión. El complejo está compuesto por 4 hélices  $\alpha$ , de las cuales dos son aportadas por SNAP-25, una por la syntaxina y otra por la sinaptobrevina (Poirier *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 1998)(Figura I-5).



**Figura I-5.** A) Dominios estructurales de las proteínas SNARE: syntaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina/VAMP. B), C) Esquemas de los dos modos de interacción de Munc18 con las proteínas SNARE durante la exocitosis: unión de Munc18 a la syntaxina en conformación cerrada que ocluye el motivo SNARE (B), y unión de Munc18 al complejo trans-SNARE en formación que depende del extremo amino terminal de la syntaxina (C). D) Modelo del complejo SNARE ensamblado. Adaptado de (Sudhof y Rizo 2011).

Lo que previene la formación del complejo SNARE es que la syntaxina-1 se encuentra en conformación cerrada por lo que es necesario el paso a conformación abierta para que tenga lugar el inicio del ensamblaje del complejo SNARE (Dulubova *et al.*, 1999; Misura *et al.*, 2000) y cuando esto ocurre se considera que la vesícula ha adquirido competencia para la fusión. Munc13 cataliza el cambio conformacional de la syntaxina-1 de conformación cerrada a abierta, promoviendo así el ensamblaje del complejo SNARE (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2013). Según las cuatro helices del complejo SNARE se van cerrando en la dirección N a C terminal (Hanson *et al.*, 1997) las bicapas de la vesícula sináptica y de la membrana plasmática se van acercando y comienzan a fusionarse (Figura I-6). El cierre del complejo fuerza la fusión entre ambas membranas que se encuentran muy próximas, desestabilizando así sus superficies hidrofóbicas, basándose así la formación del complejo SNARE en interacciones de tipo hidrofóbico. La fusión de las dos bicapas lipídicas requiere una elevada cantidad de energía que es proporcionada por el ensamblaje del complejo SNARE, ya que este es un proceso altamente exergónico (Jahn y Scheller 2006; Sudhof y Rizo 2011). Previo a la formación del complejo Munc18 se encuentra unida a syntaxina-1 en conformación cerrada. A medida que esta conformación se abre Munc18 permanece unida a syntaxina durante el proceso de ensamblaje del complejo pero pasa de estar unida a syntaxina a interactuar con el complejo SNARE (Dulubova *et al.*, 2007). El ensamblaje completo del complejo trans-SNARE junto con la participación de la activación por calcio de sinaptotagmina y la asistencia de la proteína complexina lleva a la apertura del poro de fusión. La expansión del poro de fusión transforma el complejo inicial trans-SNARE en complejo cis-SNARE que da lugar al desensamblaje y reciclamiento del mismo mediante el NSF, completando así el ciclo. Por otro lado, el desensamblaje del complejo SNARE depende de ATPasas específicas que están evolutivamente conservadas (NSF) y de sus adaptadores (SNAPs) (Sollner *et al.*, 1993). La formación correcta de los complejos SNARE depende del mantenimiento de las conformaciones activas de los dominios SNARE, y de la ausencia de interacciones inespecíficas. Estas funciones dependen de proteínas chaperonas como CPS (del inglés *Cysteine String Proteins*) y de sinucleínas (Burre *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011), cuya disfunción se ha asociado con neurodegeneración (Chandra *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2012).



**Figura I-6.** Ciclo de las proteínas SNARE y fusión de las vesículas sinápticas dependiente de calcio. Durante el proceso de anclaje de las vesículas a la membrana la sinaptobrevina junto con la sintaxina y SNAP-25 forman el complejo trans-SNARE. Previo a la formación de este complejo, Munc18-1 se encuentra unida a sintaxina, que se encuentra en conformación cerrada. Cuando el complejo SNARE está parcialmente ensamblado se unen las complexinas, anclando de este modo las vesículas a la membrana en mayor grado ("superpriming"). La unión de calcio a la sinaptotagmina favorece su interacción con el complejo SNARE y fosfolípidos que da lugar a la apertura del poro de fusión. Posteriormente el complejo cis-SNARE es desensamblado por ATPasas y las vesículas son recicladas. Adaptado de (Sudhof 2013).

#### 2.4.2. Fusión calcio dependiente

La fusión de las vesículas con la membrana presináptica tras la entrada de calcio se dispara con la activación de la proteína de la vesícula sináptica sinaptotagmina, que actúa como un sensor de calcio para la exocitosis. En vertebrados se han descrito hasta 16 isoformas diferentes que se expresan en neuronas y en células neuroendocrinas (Sudhof 2012). Las sinaptotagminas son proteínas transmembrana altamente conservadas con dos dominios citoplasmáticos C2 (Perin *et al.*, 1990; Perin *et al.*, 1991) que unen calcio (Brose *et al.*, 1992). Estos dominios C2A y C2B son capaces de combinarse con dos y tres iones de calcio, respectivamente. Ambos dominios se unen de forma calcio-dependiente a fosfolípidos ácidos. Además el dominio C2B contiene una región que une membranas enriquecidas en fosfatidil

inositol 4,5 bisfosfato (PIP(4,5)<sub>2</sub>) (Brose *et al.*, 1992; Davletov y Sudhof 1993). El papel del calcio en esta interacción parece disminuir las fuerzas electrostáticas entre los dominios C2 y las membranas aniónicas (Radhakrishnan *et al.*, 2009; McMahon *et al.*, 2010). Las sinaptotagminas requieren como cofactor a las complexinas, que son pequeñas proteínas citosólicas que se unen al complejo SNARE (Figura 6). Las complexinas funcionan como factor iniciador de los complejos SNARE, promoviendo su ensamblaje e induciendo la fusión vesicular (Xue *et al.*, 2010) y también como freno para la liberación de neurotransmisor espontánea (Giraudou *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2007; Maximov *et al.*, 2009; Hobson *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011; Jorquera *et al.*, 2012; Kaeser-Woo *et al.*, 2012). Así, se ha postulado que la sinaptotagmina contribuiría a estabilizar los complejos trans-SNARE impidiendo la fusión espontánea de las membranas, mientras que la entrada de calcio promovería tanto la incorporación de la sinaptotagmina a la membrana plasmática como el desplazamiento de la complexina de la superficie del complejo trans-SNARE, posibilitando la exocitosis (Rizo *et al.*, 2006; Chicka *et al.*, 2008; Sudhof 2012; Sudhof 2014).

#### 2.4.3. Endocitosis

Las sinapsis del SNC contienen un número limitado de vesículas sinápticas en la zona activa. Además, los terminales sinápticos suelen estar alejados de los somas, lugar donde se lleva a cabo la síntesis tanto de las proteínas como de los lípidos que componen las vesículas sinápticas. Esto hace necesario el reciclamiento local de las vesículas sinápticas después de la exocitosis, con el fin de generar nuevas vesículas cargadas de neurotransmisor ante estímulos que requieran una elevada frecuencia de exocitosis (De Camilli *et al.*, 2001). Las primeras evidencias del reciclamiento vesicular fueron descritas en la unión neuromuscular por Heuser y Reese en 1973, y pusieron de manifiesto que la endocitosis ocurría por un mecanismo dependiente de clatrina.

Otros estudios en el mismo modelo demostraron la existencia de otras formas de reciclamiento que no implicaban la fusión completa de las vesículas con la membrana plasmática ni la formación de estructuras recubiertas de clatrina (Ceccarelli *et al.*, 1973), como la endocitosis que sigue a fenómenos de “*kiss-and-run*”. El proceso de *kiss and run* implica la retirada de la vesícula después de la apertura del poro de fusión sin colapsar ni continuar la fusión con la membrana plasmática. Este modo de endocitosis, bien caracterizado en células no neuronales (Alvarez de Toledo *et al.*, 1993), se ha observado también en neuronas (Gandhi y Stevens 2003). En este último modo de exo/endocitosis la fusión de la vesícula sináptica no es completa y por tanto no se requiere una fisión vesicular después de la exocitosis.

La endocitosis masiva (del inglés *bulk endocytosis*) permite la recuperación de grandes proporciones de membrana por medio de la formación de endosomas. Este

mecanismo parece operar tras la fusión de una gran número de vesículas sinápticas tras estímulos de alta intensidad con el fin de evitar el incremento de superficie de la membrana (Clayton y Cousin 2009).

Por último, hay otro modo de endocitosis descrito recientemente denominado endocitosis ultrarápida que ocurre en los sitios que flanquean la zona activa que es 200 veces más rápido que la endocitosis mediada por clatrina y que no implica la recuperación de las vesículas intactas como supone *kiss and run*, sino que depende de la formación de vesículas endocíticas de gran tamaño que forman endosomas que a su vez, generan vesículas cubiertas de clatrina (Watanabe *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014).

El tipo de endocitosis tras los eventos de exocitosis depende de factores como la intensidad del estímulo (Heuser y Reese 1973; Wu y Wu 2007; Clayton y Cousin 2009)(Heuser y Reese, 1973; Wu y Wu, 2007; Clayton *et al.*, 2009), el modelo neuronal del estudio (Granseth *et al.*, 2007) o el estado de desarrollo de las neuronas de la preparación (Bartolome-Martin *et al.*, 2012).

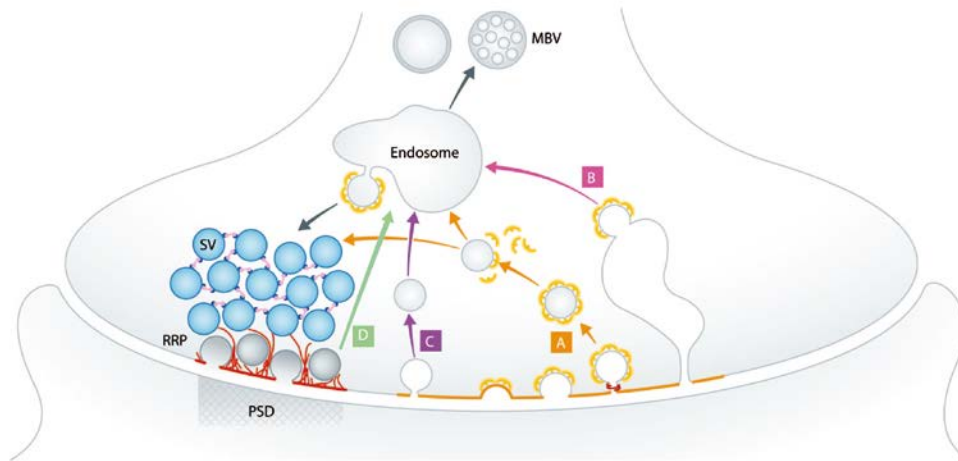
#### Endocitosis mediada por clatrina

La endocitosis mediada por clatrina (Figura I-7) parece ser la forma predominante y desde luego es la mejor caracterizada para el reciclamiento de las vesículas sinápticas (Granseth *et al.*, 2006; Saheki y De Camilli 2012). Este mecanismo se asocia a estimulaciones más débiles y es capaz de regenerar vesículas sinápticas unos 20 segundos después de la exocitosis. La endocitosis mediada por clatrina tiene lugar en la zona perisináptica. La nucleación de la malla de clatrina empieza con el ensamblaje de proteínas adaptadoras en una determinada región de la bicapa lipídica rica en PIP(4,5)<sub>2</sub> (Cremona *et al.*, 1999), que causa la invaginación de ese fragmento de membrana. Posteriormente y de manera cooperativa la interacción entre las proteínas adaptadoras, otros factores adicionales y las moléculas de clatrina permiten el crecimiento rápido de la malla de clatrina y la inducción de la curvatura necesaria para la gemación de la vesícula sináptica. La fisión de la vesícula tiene lugar en la parte más estrecha de la invaginación o “cuello” y requiere la actividad GTPasa dinamina (Koenig y Ikeda 1989; Conner y Schmid 2003; Ferguson y De Camilli 2012). Por último, la malla de clatrina es desensamblada con la ayuda de la fosfatasa sinaptojanina (McPherson *et al.*, 1996; Ramjaun y McPherson 1996), liberándose así una vesícula nueva dispuesta a ser exocitada una vez sea cargada de nuevo con el neurotransmisor (Dittman y Ryan 2009; Saheki y De Camilli 2012). La malla de clatrina comprende dos capas, una exterior compuesta por las moléculas de clatrina y una interior compuesta por las proteínas adaptadoras. Cada subunidad de clatrina está compuesta por tres cadenas polipeptídicas pesadas y tres cadenas ligeras que forman una estructura de tres brazos, el trisquelion. Los trisqueliones de clatrina se ensamblan en estructuras

convexas formadas por una red de hexágonos y pentágonos que forman las depresiones revestidas en la cara citosólica de las membranas. Los adaptadores de clatrina comprenden un módulo plegado de unión a la membrana y una serie de brazos flexibles, que pueden terminar en pequeños módulos plegados adicionales (Edeling *et al.*, 2006). El módulo de unión a la membrana une por un lado dominios presentes en las proteínas vesiculares denominados motivos endocíticos (generalmente basados en tirosinas), que están expuestos al citoplasma, y por otro las cabezas polares del PIP(4,5)<sub>2</sub>, fosfoinosítido que se encuentra en abundancia en la membrana plasmática (Beck y Keen 1991; Traub 2003; Owen 2004). Los brazos de estos adaptadores unen las cadenas pesadas de la clatrina, a otras moléculas adaptadoras y factores endocíticos (Edeling *et al.*, 2006). La proteína adaptadora más abundante es AP-2 (del inglés *Adaptor Protein 2*) que interacciona con motivos endocíticos derivados de tirosina, como es el de la proteína vesicular sináptica SV2 (Haucke y De Camilli 1999), y con motivos basados en dileucinas, como los presentes en los transportadores de neurotransmisores vesiculares (Bonifacino y Traub 2003; Fei *et al.*, 2008). Otra proteína adaptadora que cabe destacar es la proteína AP180 (Morris *et al.*, 1990), que interacciona con la proteína sinaptobrevina por medio del dominio SNARE de la misma (Koo *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011). También hay que mencionar a la proteína Stonina 2, que junto con AP-2, juega un papel en la internalización de la sinaptotagmina, el sensor de calcio de las vesículas sinápticas (Zhang *et al.*, 1994; Walther *et al.*, 2001; Walther *et al.*, 2004; Diril *et al.*, 2006). De este modo la principal función de las proteínas adaptadoras sería la selección de la carga del fragmento de membrana que será incorporado en las vesículas sinápticas. La fuerza mecánica necesaria para el proceso de la gemación podría ser proporcionada por el ensamblaje de la clatrina en forma de trisquelion, aunque se han descrito también factores endocíticos que podrían ayudar a la inducción de la curvatura de la membrana (Ford *et al.*, 2002). Otras proteínas importantes en la inducción de la curvatura son la endofilina, a través de su interacción con la dinamina y la sinaptojanina, la amfifisina y la sindapina. Como ya se ha mencionado anteriormente la fisión del intermediario endocitótico de la membrana plasmática depende de la dinamina, que forma oligómeros en espiral en los cuellos de las vesículas sinápticas. Se conocen 3 isoformas de dinamina, de las cuales la 1 y la 3 parecen relevantes para el reciclamiento de las vesículas sinápticas (Cao *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2007). Los animales carentes de esta enzima muestran intermediarios endocitóticos bloqueados en el paso previo a la fisión en su ultraestructura (Koenig y Ikeda 1989; Ferguson *et al.*, 2007; Raimondi *et al.*, 2011). La dinamina se ensambla formando anillos alrededor del cuello de las vesículas y la hidrólisis de GTP aporta la energía necesaria para la escisión de la vesícula de la membrana plasmática. La unión de la dinamina se da únicamente en los pasos finales del proceso de invaginación. La sinaptojanina promueve la hidrólisis de PIP(4,5)<sub>2</sub> que se encuentra en la membrana de las vesículas, lo que parece limitar los sitios de unión de los adaptadores de clatrina (Cremona *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*,



2008). De forma paralela, la ATPasa Hsc70 y su cofactor auxilina (Guan *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2010) promueve el desensamblaje de la malla de clatrina.



**Figura I-7.** Tras la liberación del neurotransmisor las vesículas sinápticas son recuperadas mediante diferentes tipos de endocitosis: A) mediada por clatrina. B) en masa. C) ultra-rápida. D) kiss-and-run. Modificado de (Ackermann *et al.*, 2015).

#### Endocitosis de tipo “*kiss and run*”

La endocitosis de tipo *kiss and run* (Figura I-7) se ha relacionado con estimulaciones más intensas y se cree que ocurre en una escala temporal de alrededor de 1s (Alabi y Tsien 2013). Este proceso fue estudiado en un principio en células no neuronales (Alvarez de Toledo *et al.*, 1993) y posteriormente en células neuronales (Fesce *et al.*, 1994). En este caso las vesículas sinápticas no se fusionan por completo con la membrana al liberar el neurotransmisor y por lo tanto mantienen su identidad molecular. Cabe destacar que las evidencias sobre este tipo de endocitosis son mayoritariamente indirectas y basadas en observaciones que no podían ser explicadas por mecanismos de endocitosis mediada por clatrina o endocitosis en masiva. Entre estas destacan la descarga incompleta de sondas del tipo FM (Aravanis *et al.*, 2003), las medidas de capacitancia en sinapsis gigantes y el reciclamiento de Qdots (del inglés *Quantum dots*) (Zhang *et al.*, 2009). Los “*quantum dots*” son partículas fluorescentes de tamaño definido, que son captadas por los terminales cuando hay una fusión completa de la vesícula y que luego solo podían ser liberadas cuando ocurre otra fusión completa, pero no cuando se da una fusión incompleta del tipo *kiss and run*. Así, los fenómenos de *kiss and run* han sido observados en células de hipocampo (Stevens y Williams 2000; Aravanis *et al.*, 2003; Harata *et al.*, 2006), en células dopaminérgicas de mesencéfalo (Staal *et al.*, 2004) y en la unión neuromuscular de *Drosophila* (Verstreken *et al.*, 2002) entre otras preparaciones. Además, hay que mencionar que los estudios de la endocitosis de tipo *kiss and run* siempre mencionan este tipo de

endocitosis no como una vía principal de reciclamiento de vesículas sinápticas, sino como una vía paralela a otros tipos de endocitosis (Saheki y De Camilli 2012). Este tipo de endocitosis debería implicar mecanismos capaces de retener la curvatura formada en la membrana tras el contacto con la vesícula. Algunos de estos mecanismos podrían ser la fusión incompleta entre ambas bicapas de la membrana con la apertura de un poro pequeño que permita la salida de moléculas de neurotransmisor, la presencia de una estructura de tipo collar que no permita la fusión completa de la vesícula con la membrana o la existencia de una estructura rígida en la zona activa que no permita la acomodación de membrana extra después de la exocitosis (Saheki y De Camilli 2012). Así existe gran controversia respecto a la relevancia y a los mecanismos de *kiss and run* en células neuronales (Alabi y Tsien 2013). Algunos estudios sugieren que este tipo de exocitosis es la predominante, al menos en determinadas condiciones (Gandhi y Stevens 2003; Richards *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Leitz y Kavalali 2011), mientras que para otros su existencia es minoritaria o incluso nula (Granseth *et al.*, 2006; Balaji y Ryan 2007; Chen *et al.*, 2008).

#### Endocitosis masiva

El término de endocitosis masiva o *bulk endocytosis* (Figura I-7) implica aquellos modos de recuperación de membrana que se desencadenan tras estimulaciones de alta frecuencia, cuando un gran número de vesículas se fusionan con la membrana plasmática, generando intermediarios endocitóticos de gran tamaño (Heuser y Reese 1973; Miller y Heuser 1984; Shupliakov *et al.*, 1997; Harata *et al.*, 2001; Paillart *et al.*, 2003; Clayton *et al.*, 2007; Perez Bay *et al.*, 2007; Wu y Wu 2007; Clayton *et al.*, 2008; Clayton *et al.*, 2010; Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Wenzel *et al.*, 2012). Se cree que la función de este tipo de endocitosis no sería la de recuperar vesículas a corto plazo, sino la de evitar una acumulación excesiva de membrana plasmática en la zona activa (Clayton y Cousin 2009). De este modo, cuando la endocitosis mediada por clatrina se satura, debido a las altas frecuencia de estimulación y de exocitosis, se pondrían en marcha mecanismos de endocitosis en masa. Los endosomas generados durante el proceso podrían dar lugar a vesículas nuevas mediante gemación (Teng *et al.*, 2007; Clayton *et al.*, 2008; Clayton y Cousin 2009), aunque algunos estudios han descrito únicamente la acumulación de estos endosomas sin la generación de nuevas vesículas (Perez Bay *et al.*, 2007; Bartolome-Martin *et al.*, 2012). La gemación de nuevas vesículas a partir de los endosomas podría estar relacionada con las proteínas adaptadoras AP-1 y AP-3 (Cheung y Cousin 2012) pero no con la GTPasa dinamina (Ferguson *et al.*, 2007; Saheki y De Camilli 2012). Según algunos autores este tipo de endocitosis no termina al finalizar la estimulación (Clayton *et al.*, 2008), mientras que también hay evidencias de que los endosomas formados se mantienen unidos al espacio extracelular después de la estimulación (Ferguson *et al.*, 2007; Bartolome-

Martin *et al.*, 2012; Cheung y Cousin 2013). El mecanismo molecular de este tipo de endocitosis solo se conoce parcialmente.

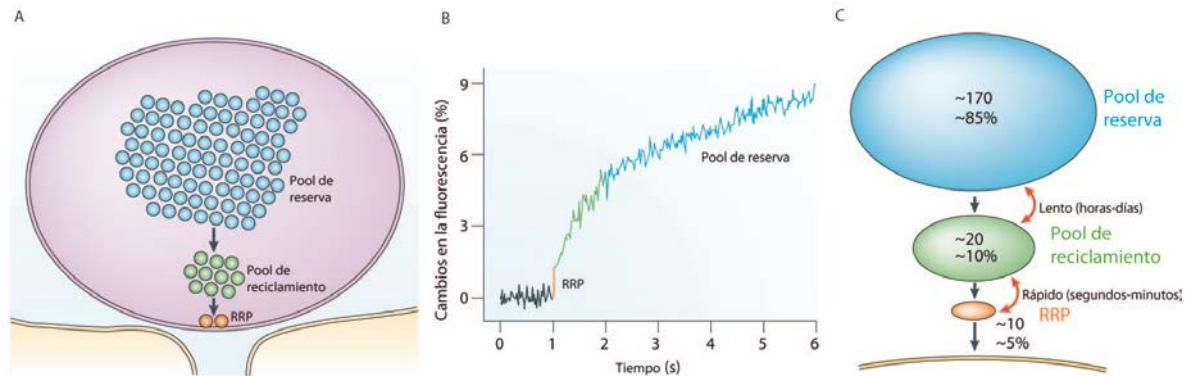
#### Endocitosis ultrarápida

Combinando la estimulación optogenética y la fijación por congelación a alta presión se ha descrito la endocitosis ultra-rápida (del inglés *ultrafast endocytosis*) en cultivos de neuronas hipocampales (Watanabe *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014). En respuesta a un estímulo lumínico para estimular las células se observa que la endocitosis tiene lugar entre 50-100ms después del estímulo en los bordes de la zona activa. Este forma de endocitosis rinde endosomas equivalentes a 4 vesículas que empiezan a generar VSs individuales 5 segundos después de la estimulación. Parece que la etapa inicial de creación de estructuras intermedias de tipo endosomal no depende de clatrina a diferencia de la gemación de vesículas a partir de estos endosomas. Este tipo de endocitosis también parece ser dependiente de actina y dinamina. Además, cuando esta vía no funciona el reciclamiento de vesículas tiene lugar mediante endocitosis mediada por clatrina. Los estudios del grupo de Watanabe sugieren que este es un mecanismo de retirada de membrana recién añadida a la membrana plasmática prácticamente instantáneo. Aún se desconoce si la endocitosis ultrarápida es un mecanismo general de recuperación de vesículas o es una especialización en sinapsis con tasas de alto reciclamiento vesicular para reestablecer rápidamente el área de la superficie de la membrana.

#### 2.5. Grupos ó "*pools*" de vesículas sinápticas

La idea de que no todas las vesículas son equivalentes desde el punto de vista funcional fue introducida por primera vez por Birks y Macintosh en el año 1961, estudiando los ganglios simpáticos de gato, al observar que algunas vesículas eran liberadas más fácilmente que otras. Desde entonces este concepto se ha extendido a las preparaciones más comunes como la unión neuromuscular de la mosca de la fruta y de la rana, las células bipolares de la retina de la carpa dorada, el cáliz de Held de mamíferos y cultivos de neuronas hipocampales. Se han propuesto 3 grupos de vesículas sinápticas: el grupo de vesículas listo para ser liberado (RRP, del inglés *Readily Releasable Pool*), el de reciclamiento y el de reserva (Rizzoli y Betz 2005). El grupo de vesículas de reciclamiento está constituido por las vesículas que son liberadas bajo estimulaciones moderadas o fisiológicas y representan el 10-20% de la totalidad de vesículas. El RRP está compuesto por las vesículas del pool de reciclamiento que están amarradas a la membrana en la zona activa, de forma que se liberan de manera inmediata a la estimulación. El grupo de vesículas de reserva consiste en aquellas vesículas que se resisten a ser liberadas con estímulos fisiológicos, y que, por tanto, se

fusionan con la membrana únicamente bajo condiciones de estimulación fuertes, cuando las vesículas de grupo de reciclamiento está agotado (Figura I-8).



**Figura I-8.** Modelo que muestra los distintos grupos de vesículas y su distribución. A) Esquema de los grupos de vesículas. B) Componentes cinéticos de liberación en células bipolares de carpa tras una despolarización. C) Distribución de las vesículas entre los pool en el SNC de rata. El pool de reserva representa la mayor parte de la totalidad de las vesículas sinápticas (80-90%). El pool de reciclamiento tiene un tamaño considerablemente menor, conteniendo el 10-15% de las vesículas. El RRP consiste en unas pocas vesículas (1%), que parecen estar amarradas a la zona activa y listas para ser liberadas. Adaptado de (Rizzoli y Betz 2005).

La liberación de las vesículas del RRP se puede inducir con estimulaciones mínimas o con la perfusión de una solución de sacarosa hipertónica (Rosenmund y Stevens 1996). Dentro de las vesículas que componen el RRP es posible que no todas tengan las mismas propiedades en relación con su liberación. Así, estudios en el cáliz de Held han mostrado que el RRP tiene un componente de liberación rápido y otro lento (Sakaba y Neher 2001). Este grupo de vesículas de reciclamiento mantiene la liberación de vesículas bajo condiciones de estimulación moderadas y se ha estimado que contiene alrededor de 5-20% de la totalidad de vesículas. A frecuencias de estimulación en el rango fisiológico este grupo de vesículas se recicla constantemente (Harata *et al.*, 2001; de Lange *et al.*, 2003; Kuromi y Kidokoro 2003; Richards *et al.*, 2003), y es reabastecido con vesículas recién recicladas. El grupo de vesículas de reserva puede ser movilizado sólo bajo condiciones de estimulación intensa. En la mayoría de las preparaciones estudiadas este grupo de vesículas contiene la gran mayoría del total de vesículas, alrededor de un 80-90% (Rizzoli y Betz 2005). No obstante hay que señalar que en los experimentos en los que se ha podido determinar la exocitosis acumulada se ha encontrado que estas vesículas pueden constituir el 50-60% del total (Kim y Ryan 2010). Cabe destacar que el porcentaje aproximado de vesículas que pertenecen a cada grupo varía en función del modelo y la metodología empleada para su determinación. Además, es posible que el porcentaje relativo de cada uno de estos grupos de vesículas cambie durante el desarrollo (Rose *et al.*, 2013). También es objeto de controversia si las vesículas sinápticas de los diferentes grupos

tienen diferente dotación molecular (Hua *et al.*, 2011; Ramirez y Kavalali 2012), o es su posición (Holderith *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012) la que determina la pertenencia a un grupo u otro. Algunos autores sugieren que el compartimento de reserva podría actuar como un reservorio de proteínas vesiculares (Denker *et al.*, 2011). Otro estudio de los mismos autores sugiere que el porcentaje de este grupo de vesículas podría superar incluso el 90% (Denker *et al.*, 2011). No obstante hay que señalar que técnicas de imagen con pHluorinas en rodajas de cerebro (Rose *et al.*, 2013) y medidas de capacitancia (Xue *et al.*, 2013), muestran que prácticamente todas las vesículas participan en el reciclamiento y contribuyen, por tanto, a la liberación de neurotransmisor. Un aspecto importante de la fisiología sináptica es entender los mecanismos que regulan la incorporación de vesículas a los distintos grupos. En este sentido hay que señalar que, la actividad de las enzimas Cdk5 y calcineurina regula este proceso. Así, Cdk5 sería la responsable de la incorporación de las vesículas al grupo de vesículas de reserva, mientras que la actividad de la calcineurina mediaría en el paso contrario (Kim y Ryan 2010).

Por otro lado, estudios recientes han mostrado que los diferentes botones sinápticos comparten vesículas que formarían parte de un “*superpool*” de vesículas sinápticas. Estas vesículas son altamente móviles y son rápidamente intercambiadas entre terminales sinápticos (Darcy *et al.*, 2006). Las vesículas sinápticas así incorporadas muestran una fusión un tanto retardada probablemente debido a la interacción con proteínas locales de la zona activa, ya que deben ser estabilizadas para que puedan ser liberadas luego por exocitosis (Ratnayaka *et al.*, 2011). Aunque los mecanismos moleculares que determinan la movilidad de las vesículas aún no han sido bien caracterizados, una proteína que parece tener un papel importante es la sinapsina, que podría ser la responsable de mantener la integridad de los grupos de vesículas y regular el movimiento de vesículas entre terminales sinápticos (Orenbuch *et al.*, 2012).

### 3. El sistema endocannabinoide

Los endocannabinoides son mensajeros retrógrados de naturaleza lipídica que inhiben la liberación de neurotransmisor tanto a corto como a largo plazo en neuronas excitatorias e inhibitorias (Freund *et al.*, 2003; Chevalleyre *et al.*, 2006; Kano *et al.*, 2009; Alger 2012; Katona y Freund 2012). El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores de cannabinoides de tipo 1 (CB1R, del inglés *Cannabinoid Receptor*) y de tipo 2; los ligandos endógenos o endocannabinoides, de los cuales los mejor caracterizados son la araquidonil etanol amida o anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG); y las enzimas de síntesis, fosfolipasa D (PLD) y diacilglicerol lipasa  $\alpha$  (DGL $\alpha$ ), así como las enzimas de degradación de los mismos, la monoacil glicerol lipasa (MGL) y la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Además

de modular la transmisión sináptica en sinapsis maduras el sistema endocannabinoide está implicado en procesos de formación de sinapsis y en la neurogénesis (Harkany *et al.*, 2008). Mediante la modulación de la fuerza de transmisión sináptica el sistema endocannabinoide también regula diversos procesos fisiológicos como la cognición, el control motor, la ingesta y el dolor. La desregulación del sistema endocannabinoide se ha relacionado con trastornos psiquiátricos y neurológicos como la depresión y la ansiedad (Hillard *et al.*, 2012; Mechoulam y Parker 2013).

### 3.1. Síntesis de endocannabinoides

La AEA se sintetiza por la fosfolipasa D, PLD, por hidrólisis de un precursor fosfolipídico, el N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE) de manera calcio-dependiente (Di Marzo *et al.*, 1994; Cadas *et al.*, 1996). La biosíntesis de NAPE también depende de calcio y puede ser potenciada por el AMPc. Así, la despolarización de la neurona postsináptica lleva a la formación de NAPE de forma dependiente de calcio, que posteriormente se convierte en AEA por la PLD (Cadas *et al.*, 1996). El hecho de que los ratones que carecen de la enzima PLD no muestren alteraciones evidentes en el comportamiento junto con las bajas concentraciones de AEA encontradas en el encéfalo hace pensar que este endocannabinoide pueda tener una menor relevancia que 2-AG dentro del sistema endocannabinoide.

En la síntesis del 2-AG parecen estar implicadas dos enzimas, la PLC $\beta$  (Maejima *et al.*, 2005) y la DGL $\alpha$  (Yoshida *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010; Tanimura *et al.*, 2010) que actúan de forma consecutiva. Esta síntesis se induce en respuesta a un aumento transitorio de la concentración de calcio, presumiblemente tras despolarización y activación de los canales de calcio voltaje dependientes, o en respuesta a la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I, o de forma sinérgica en respuesta a la coincidencia de ambos estímulos (Brenowitz y Regehr 2005). Se cree que la enzima PLC $\beta$  es la responsable de detectar la coincidencia entre la concentración postsináptica de calcio y la señalización por el GPCR (Hashimoto *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005).

### 3.2. Receptores de cannabinoides

Los receptores de cannabinoides están acoplados a proteínas Gi/o y son responsables de la mayoría de los efectos causados por los cannabinoides endógenos y exógenos. Los receptores de tipo 1 son unos de los GPCRs (del inglés *G-Protein-Coupled Receptors*) más abundantes en el cerebro (Herkenham *et al.*, 1990). A diferencia de los receptores CB1, los receptores CB2 se encuentran sobre todo en el

sistema inmune y en menor medida en el sistema nervioso central. Aunque algunos autores han mostrado un cierto papel de estos receptores en el SNC (Van Sickle *et al.*, 2005; Xi *et al.*, 2011; den Boon *et al.*, 2012), se desconocen sus mecanismos celulares y su contribución a la función del cerebro. Aparte de los receptores clásicos de cannabinoides (CB1 y CB2) existen estudios que demuestran la participación de los receptores TRPV1 (del inglés, *Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1*) en la señalización mediada por endocannabinoides (De Petrocellis y Di Marzo 2010; Pertwee *et al.*, 2010). Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en neuronas sensoriales aferentes del SNP donde regulan la transmisión de asociada con el dolor y es activado por moléculas lipofílicas como la AEA (Di Marzo *et al.*, 2002), la N-araquidonildopamina y la capsaicina. En este sentido cabe destacar que la AEA es agonista parcial del receptor CB1, mientras que es un agonista completo de los canales TRPV1 (Smart *et al.*, 2000). Existen múltiples antagonistas exógenos de este receptor, entre los cuales se encuentran el rojo de rutenio y la capsazepina, con potencial interés terapéutico dada la relación del receptor TRPV1 con el dolor. Aparte de su expresión en el sistema nervioso periférico el receptor TRPV1 se expresa en el SNC, donde parece que regula la función sináptica.

El receptor CB1 se describió y caracterizó en 1990 (Gerard *et al.*, 1990) y se demostró que estaba ampliamente distribuido en el SNC (Matsuda *et al.*, 1990). Su localización presináptica (Katona *et al.*, 1999; Katona *et al.*, 2006) sugiere que el receptor CB1 juega un papel crucial en la regulación de la liberación de neurotransmisor. El receptor de cannabinoides de tipo 1 es un receptor de 7 hélices transmembrana que está acoplado a proteínas G heterotriméricas de tipo Gi/o y tiene una longitud de 473 aminoácidos (Herkenham *et al.*, 1990). A diferencia de otros receptores de la misma familia, el sitio de unión al ligando se encuentra en la región transmembrana (Song y Bonner 1996), debido a la naturaleza hidrofóbica que tiene el ligando. Se ha demostrado que los cannabinoides acceden al sitio de unión como consecuencia de movimientos laterales en la membrana. Se cree que en condiciones fisiológicas el receptor podría encontrarse en forma de homodímeros como otros GPCRs (Wager-Miller *et al.*, 2002) o como hetero-dímeros del receptor CB1 con otros receptores metabotrópicos (Mackie 2005). La activación del receptor CB1 tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación del neurotransmisor (Shen *et al.*, 1996; Godino *et al.*, 2005) dependiente de proteínas G (Pitler y Alger 1994) que se ejerce mayoritariamente a través de dos mecanismos. Por un lado, la inhibición de los canales voltaje dependientes de calcio por la acción del dímero  $\beta\gamma$  (Kreitzer y Regehr 2001; Brown *et al.*, 2004) por otro lado, la activación de los canales rectificadores de potasio (Mackie *et al.*, 1995; Guo y Ikeda 2004). Ambas acciones disminuyen la excitabilidad de la neurona presináptica y por tanto la liberación de neurotransmisor (Chevalleyre *et al.*, 2006). Además, la activación de la subunidad  $\alpha_i$  inhibe la enzima adenilato ciclasa causando una disminución de los niveles de AMPc (Howlett *et al.*, 1986; Childers y Deadwyler 1996; Godino *et al.*, 2005). Clásicamente se ha considerado a la proteína

quinasa dependiente de AMPc (PKA) como la mediadora de los efectos de los endocannabinoides (Chevaleyre *et al.*, 2007; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009) aunque otras proteínas reguladas por AMPc podrían ser las responsables de dichos efectos (Seino y Shibasaki 2005; Gekel y Neher 2008; Tsetsenis *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Se ha considerado que los cambios en la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$  inducidos por los cannabinoides podrían estar relacionados con los fenómenos de plasticidad a corto plazo, mientras que la disminución de los niveles de AMPc y los cambios asociados a la actividad de la maquinaria exocitótica se asocian a los mecanismos de depresión de la actividad sináptica largo plazo (Schoch *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2012).

### 3.3. Degradación

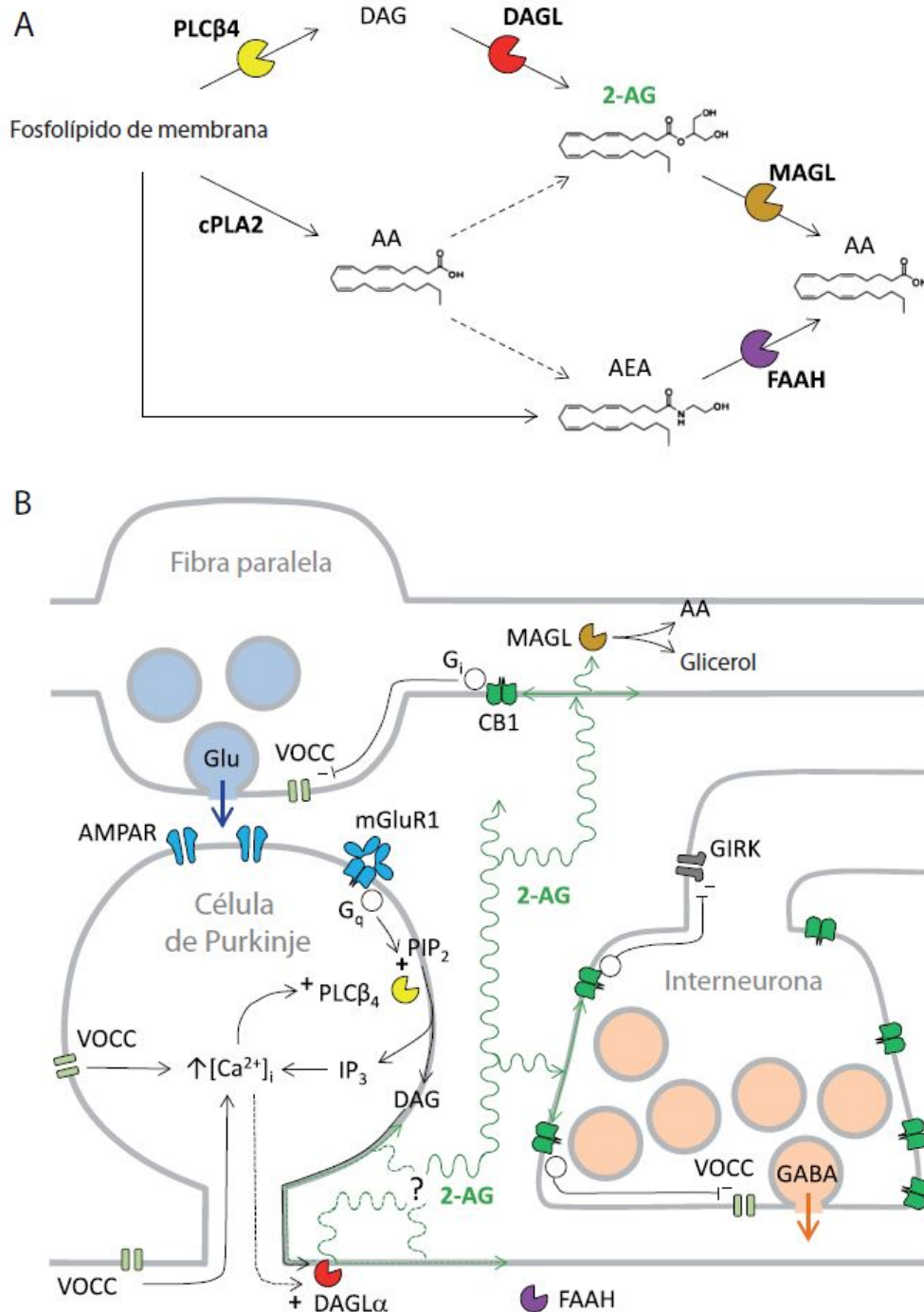
Los endocannabinoides pueden ser degradados mediante dos procesos consecutivos: hidrólisis y oxidación (Vandevorde y Lambert 2007). Entre las enzimas que catalizan la hidrólisis cabe destacar la FAAH para la anandamida y la MGL para el 2-AG. La oxidación del ácido araquidónico se lleva a cabo por la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (Willox y Royle). El 2-AG es susceptible de ser oxidado directamente por determinadas isoformas de COX y tanto el 2-AG como la anandamida pueden ser oxidadas por LOX (Vandevorde y Lambert 2007; Kano *et al.*, 2009). La FAAH se encuentra en diversos órganos entre los cuales está el cerebro. Recibió diferentes nombres hasta ser clonada a partir de hígado de rata y recibir su nombre definitivo (Cravatt *et al.*, 1996). En ratón, rata y humanos tiene una longitud de 579 aminoácidos. Esta enzima puede reconocer diferentes amidas de ácidos grasos pero muestra una marcada preferencia por la anandamida (Kano *et al.*, 2009). La FAAH también cataliza la hidrólisis del enlace éster del 2-AG in vitro, sin embargo la actividad esterasa de la enzima es menos importante in vivo. Los ratones carentes de FAAH muestran una respuesta incrementada a la administración de anandamida (Cravatt *et al.*, 2001).

La MGL fue identificada en 1976 (Tornqvist y Belfrage 1976) y actualmente se considera la principal enzima que cataliza la hidrólisis del 2-AG in vivo (Dinh *et al.*, 2002; Dinh *et al.*, 2004; Vandevorde y Lambert 2007). La MGL en ratón, rata y humanos tiene un tamaño de 303 aminoácidos. El ARN mensajero de la MGL ha sido encontrado en diferentes órganos incluido el cerebro (Dinh *et al.*, 2002). En ratones se ha demostrado que esta enzima es la responsable de la degradación del 85% del 2-AG. Además, los ratones carentes de la MGL muestran un incremento significativo en los niveles de 2-AG (Chanda *et al.*, 2010; Schlosburg *et al.*, 2010).

La distribución de la enzima FAAH es casi exclusivamente postsináptica, mientras que la de la MGL es presináptica (Gulyas *et al.*, 2004). Este hecho podría estar relacionado con la posible función de la anandamida a modo de señalizador



postsináptico, mediante la activación de receptores TRPV1 (Grueter *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2011).



**Figura I-9.** Componentes del sistema endocannabinoide en el cerebelo. A) Vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides. Los endocannabinoides se sintetizan a partir de fosfolípidos de membrana mediante la acción de fosfolipasas (PL). DAG: diacilglicerol, AA: ácido araquidónico, 2-AG: 2-araquidonil glicerol, AEA: anandamida, DAGL: diacilglicerol lipasa. La degradación de los endocannabinoides depende principalmente de dos enzimas, la MAGL: monoacil glicerol lipasa y la FAAH: amidohidrolasa de ácidos grasos. B) Representación simplificada de las dos sinapsis del cerebelo con mayor expresión del receptor CB1: entre las fibras paralelas de las neuronas granulares y las células de Purkinje, y entre las interneuronas y las células de Purkinje. La unión de glutamato a los receptores mGluR1 y la entrada de calcio en la célula de Purkinje provocarían la síntesis de endocannabinoides que posteriormente actuarían en la fibra paralela y en algunas interneuronas inhibiendo la liberación de neurotransmisor. Adaptado de (Marcaggi 2015).

### 3.4. Plasticidad mediada por cannabinoides

Desde los primeros estudios (Kreitzer y Regehr 2001; Maejima *et al.*, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson y Nicoll 2001) se han obtenido múltiples evidencias sobre la señalización retrógrada por endocannabinoides en diferentes tipos de sinapsis en el SNC, así como sobre su implicación en fenómenos de plasticidad sináptica a corto y largo plazo (Freund *et al.*, 2003; Chevaleyre *et al.*, 2006; Heifets y Castillo 2009; Kano *et al.*, 2009; Alger 2012; Katona y Freund 2012). Como se ha mencionado anteriormente los endocannabinoides se sintetizan y liberan desde la neurona postsináptica de manera dependiente de actividad o de forma tónica en condiciones basales. Mediante la activación de receptores CB1 presinápticos los cannabinoides inhiben la liberación de neurotransmisor de forma transitoria (STD, del inglés *Short-Term Plasticity*) o de forma persistente (LTD, del inglés *Long-Term Plasticity*).

#### 3.4.1. Plasticidad a corto plazo: DSE y DSI

La Supresión de la Inhibición inducida por despolarización (DSI) en sinapsis inhibitorias fue descrita por primera vez en el cerebelo por Isabel Llano (Llano *et al.*, 1991) en registros de corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) de las células de Purkinje. En realidad lo que ocurría es que la despolarización postsináptica inducía la síntesis de cannabinoide dependiente de calcio, el cannabinoide difundía retrógradamente hasta el terminal presináptico inhibiendo la liberación de neurotransmisor durante varios segundos (Llano *et al.*, 1991; Vincent *et al.*, 1992). Observaciones similares fueron descritas en rodajas de hipocampo por Pitler y Alger (Pitler y Alger 1992) y en cultivos de neuronas hipocámpales (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001). Posteriormente se descubrió un fenómeno similar en sinapsis excitatorias, que se denominó Supresión de la Excitación inducida por Despolarización (Honore *et al.*, ; Kreitzer y Regehr 2001). El hecho de que los endocannabinoides liberados desde la postsinapsis activen receptores CB1 presinápticos fue demostrado mediante el bloqueo de la DSE con antagonistas de CB1 (Kreitzer y Regehr 2001; Maejima *et al.*, 2001) y en ratones carentes del receptor (Safo y Regehr 2005). La síntesis de los endocannabinoides requiere la despolarización de la neurona postsináptica lo que promueve la entrada de calcio que activa las enzimas de síntesis de endocannabinoides (Brenowitz y Regehr 2003; Maejima *et al.*, 2005; Brenowitz *et al.*, 2006). Esta síntesis también puede ser inducida por la activación de receptores metabotrópicos de tipo 1 postsinápticos que están acoplados a proteínas  $G_{q/11}$  y a la subsiguiente estimulación la  $PLC\beta$ . Algunos estudios sugieren que estas dos formas de síntesis de endocannabinoides podrían funcionar de manera conjunta y sinérgica. De este modo la síntesis de endocannabinoides sería el resultado de una detección de

actividad postsináptica coincidente mediada por la PLC $\beta$  (Kim *et al.*, 2002; Brenowitz y Regehr 2003; Maejima *et al.*, 2005) ya que su activación depende de Ca<sup>2+</sup> y de proteínas G<sub>q/11</sub>. Además el ratón que carece de esta enzima no muestra una síntesis aumentada ante la combinación de ambos tipos de estímulos (Maejima *et al.*, 2005).

#### 3.4.2. Plasticidad a largo plazo, LTD

Poco después de ser descritos los fenómenos de DSE y DSI se demostró que los cannabinoides también ejercían una inhibición de la liberación de neurotransmisor de manera duradera (LTD) tanto en neuronas excitadoras (Gerdeman *et al.*, 2002; Robbe *et al.*, 2002), como en neuronas inhibitorias (Marsicano *et al.*, 2002; Chevalleyre y Castillo 2003). Esta depresión a largo plazo se ha estudiado en diferentes regiones cerebrales como el estriado dorsal, la amígdala, el hipocampo, el núcleo accumbens, el cerebelo, los colículos superiores y el área tegmental ventral. La inducción de la depresión a largo plazo por los cannabinoides está relacionada con la inhibición de la adenilato ciclase y la disminución de los niveles de AMP cíclico en la neurona presináptica (Chevalleyre y Castillo 2003; Chevalleyre *et al.*, 2006; Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009). La inducción de la LTD requiere tiempos de activación del receptor CB1 mucho mayores que los requeridos para la inducción de los fenómenos de DSI y DSE (Chevalleyre y Castillo 2003; Ronesi *et al.*, 2004).

Cabe destacar que en algunas sinapsis la LTD dependiente del sistema cannabinoide implica sólo a la fase de inducción (Safo y Regehr 2005; Heifets *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009; Castillo *et al.*, 2012) y no a la fase de mantenimiento de la misma. Esto está de acuerdo con la observación de que el lavado o la retirada del agonista cannabinoide después de la inducción de la LTD no revierte el fenómeno en las sinapsis en las que ha sido estudiado (Chevalleyre y Castillo 2003; Sjostrom *et al.*, 2003), lo que sugiere que el mantenimiento de la LTD no depende de la acción de los cannabinoides. En la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje la inducción de la LTD requiere la activación de la neurona aferente de forma simultánea a la exposición al endocannabinoide (Ademark y Lovinger 2007; Singla *et al.*, 2007; Heifets *et al.*, 2008). De manera que sólo las sinapsis activas que detecten los endocannabinoides expresarán la depresión a largo plazo. Se ha propuesto que el mantenimiento de la LTD en algunas sinapsis podría estar relacionado con la activación de receptores NMDA presinápticos (Sjostrom *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2006; Nevian y Sakmann 2006; Rodriguez-Moreno y Paulsen 2008) y con la entrada de calcio en la neurona presináptica, hecho que contrasta con la inhibición de la liberación de neurotransmisor como causante de la depresión sináptica a corto plazo dependiente de endocannabinoides. El incremento en la entrada de calcio dependiente de receptores NMDA podría activar a la fosfatasa calcineurina que es requerida para el

mantenimiento de la LTD en algunas interneuronas (Heifets *et al.*, 2008). Algunos estudios relacionan también el mantenimiento de la LTD con la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO) desde la presinapsis que difundiría sobre la neurona postsináptica (Safo y Regehr 2005). En la sinapsis establecida entre la fibra paralela y la célula de Purkinje la inhibición de la síntesis de NO previene la inducción de LTD incluso tras la aplicación de agonista del receptor CB1 (Safo y Regehr 2005). La expresión postsináptica de este fenómeno es una de las peculiaridades que presenta la LTD mediada por cannabinoides en las sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje en el cerebelo. Existen varias evidencias sobre la expresión postsináptica de la LTD mediada por cannabinoides entre las cuales están la falta de cambio en la facilitación de liberación de neurotransmisor, las medidas del coeficiente de variación que indican cambios en la postsinapsis y la respuesta reducida al glutamato exógeno (Wang *et al.*, 2000; Ito 2001) y la disminución de los receptores AMPA en superficie (Wang y Linden 2000; Xia *et al.*, 2000). Sin embargo, hay que destacar que los receptores CB1 se expresan mayoritariamente en las fibras paralelas y no se han detectado en las células de Purkinje (Gulyas *et al.*, 2004), lo que hace difícil explicar la expresión postsináptica del fenómeno. La inducción de la LTD requiere la activación de la fibra paralela que provoca la liberación de glutamato y NO, que activan posteriormente a los receptores AMPA y mGluR1 y a la guanilato ciclasa, respectivamente en la célula de Purkinje (Shibuki y Okada 1991; Aiba *et al.*, 1994). El NO y el glutamato, junto con el aumento de calcio provocado por la estimulación simultánea de las fibras trepadora y paralela, activan vías de señalización que en última instancia reducen la respuesta de los receptores AMPA de la célula de Purkinje (Lev-Ram *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Ito 2001). La implicación del receptor CB1 introduce un paso adicional de regulación en el proceso (Safo *et al.*, 2006). La liberación de glutamato activa a los receptores AMPA y mGluR1 que provoca la síntesis y liberación de 2-AG, activando el eCB su vez a los receptores CB1 en la presinapsis. Esta activación presumiblemente da lugar a la liberación de un mensajero anterógrado que actuaría en la célula postsináptica induciendo la LTD. Dado que el aumento de NO y de calcio en la neurona postsináptica son capaces de inducir LTD, es probable que la activación del receptor CB1 promueva la liberación de NO desde la presinapsis. La mayoría de autores también coinciden en que la inducción de la LTD depende de la liberación de cannabinoides y tiene una expresión presináptica, mientras que el mantenimiento de la misma es independiente de cannabinoides y se expresa de forma postsináptica (Safo *et al.*, 2006).

La mayoría de las evidencias indican que la inhibición de la vía AMPc/PKA dependiente de la activación del receptor CB1 es crucial para la inducción de formas presinápticas de LTD tanto en sinapsis inhibitorias como excitatorias. Esta vía de señalización, aunque modulada en sentido contrario, estaría también implicada en procesos de LTP, cuyo mecanismo de expresión se traduciría en cambios prolongados sobre en la maquinaria exocitótica (Tzounopoulos *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2002; Lonart *et al.*, 2003). Los cambios duraderos en el funcionamiento de la maquinaria

exocitótica por regulación de la adenilato ciclasa se han asociado con la actividad de la proteína RIM1. En este contexto se ha identificado la fosforilación por PKA de un residuo de serina 413 de RIM1 alfa como responsable de la LTP. Ahora, los datos de ratones mutantes en los que la mencionada serina había sido sustituida por alanina mostraban que la LTP de las fibras musgosas y del cerebelo, así como LTD del hipocampo eran normales (Kaesler *et al.*, 2008). Otra proteína de la maquinaria exocitótica que podría estar implicada en estos procesos de LTP y LTD es la proteína Rab3 por medio de su interacción con RIM (Castillo *et al.*, 1997; Schoch *et al.*, 2002; Tsetsenis *et al.*, 2011). Dicha interacción es dependiente de que la proteína Rab3 esté unida a GTP, lo que proporcionaría un punto de regulación, ya que el estado de Rab3 (Rab3-GDP o Rab3-GTP) impide o permite, respectivamente, la interacción de Rab3 con RIM1 (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000).

Es importante señalar que en estas formas de plasticidad dependientes de endocannabinoides la transmisión sináptica se determina registrando la actividad de la neurona postsináptica que no deja de ser una medida indirecta de las acciones presinápticas de los cannabinoides en las numerosas aferencias que esta neurona recibe. Por lo que se desconoce si la modulación presináptica de los cannabinoides es similar en todos los botones sinápticos. Por ello, sería interesante poder analizar las respuestas de los cannabinoides en los botones sinápticos de manera individual con el fin de entender si existe heterogeneidad en las mismas, algo que no se detecta cuando se analizan las respuestas postsinápticas.

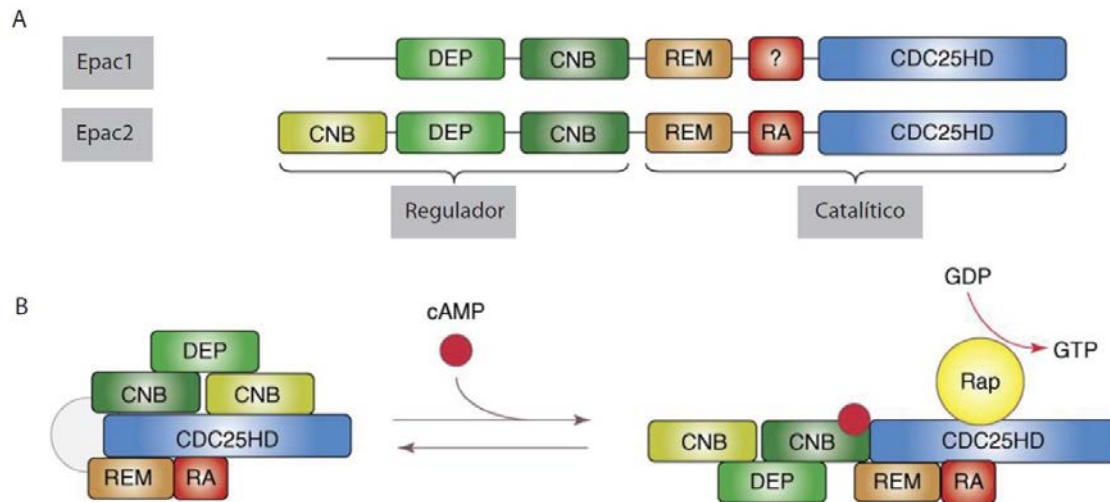
#### **4. Señalización por AMPc**

El AMPc fue identificado por primera vez en la década de 1950 como mediador intracelular y hoy en día se conoce como uno de los segundos mensajeros más importantes en la señalización celular. Su concentración en el interior de la célula en condiciones normales es de  $10^{-7}$  M, pero puede incrementarse en segundos hasta 20 veces tras la llegada de una señal extracelular. Los dos factores clave en la regulación de sus niveles son la modulación de la actividad adenilato ciclasa (AC), responsable de su síntesis a partir de ATP y la actividad fosfodiesterasa (PDE) que lo degrada a 5'-AMPc.

Como segundo mensajero el AMPc puede inducir respuestas fisiológicas que van desde el crecimiento y la diferenciación hasta la regulación de la secreción de hormonas y neurotransmisores. El efector más común de este segundo mensajero en diversos procesos celulares como en la exocitosis mediada por AMPc en organismos pluricelulares es la proteína quinasa A (PKA) (Seino y Shibasaki 2005). Esta enzima es un tetrámero, compuesto por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. La unión de cuatro moléculas de AMPc, dos a cada unidad reguladora, da lugar a un cambio

conformacional y la disociación en un dímero regulador y dos monómeros catalíticos activos (Smith *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001; Kopperud *et al.*, 2002). PKA está implicada en la potenciación de la liberación de neurotransmisor a diferentes niveles, incluidos el reclutamiento de VSs desde el pool de reserva al pool de reciclamiento, aumento de la entrada de calcio y modulación de la fusión de las vesículas con la membrana (Yoshihara *et al.*, 2000; Kuromi y Kidokoro 2003). La señalización por AMPc-PKA es importante en procesos de LTP en las fibras musgosas de hipocampo (Huang *et al.*, 1994; Weisskopf *et al.*, 1994) y en la sinapsis establecida entre la fibra paralela y célula de Purkinje en el cerebelo (Salin *et al.*, 1996; Linden y Ahn 1999). Esta señalización también está implicada en fenómenos de LTD en la vía colateral de Schaffer en la región CA1 del hipocampo (Brandon *et al.*, 1995). Aunque la PKA ha sido estudiada como la principal diana del AMPc, se han identificado otras dianas de este nucleótido como algunos canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, permeables a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en respuesta a la unión de nucleótidos cíclicos intracelulares. Además, en los últimos años se ha descrito otra diana del AMPc, que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina activado por AMPc (Epac, del inglés *Exchange Protein directly Activated by cAMP*) (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; de Rooij *et al.*, 2000). Hay dos isoformas Epac1 y Epac2, codificadas por dos genes distintos, RAPGEF3 y RAPGEF4, respectivamente (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Epac1 y Epac2 son proteínas multidominio que consisten en una región N-terminal reguladora y otra C-terminal catalítica (Figura10). La región reguladora contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNB) y un dominio implicado en la localización en membrana (DEP, Dishevelled, Egl-10 y Plecstrina). La isoforma 2 tiene además un dominio CNB adicional en la parte N-terminal. La región catalítica contiene un dominio GEF (del inglés *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) también llamado CDC25HD, un dominio REM (del inglés *Ras Exchange Motif*) que estabiliza el dominio GEF y un tercer dominio RA (del inglés *Ras Association*) que se une a Ras. La unión de AMPc a Epac induce un cambio conformacional profundo en la estructura de la proteína, favoreciendo la conformación abierta y la unión de Rap. De este modo Epac promueve el intercambio de GDP por GTP en las GTPasas monoméricas Rap1 y Rap2 (Breckler *et al.*, 2011).

## INTRODUCCIÓN



**Figura I-10.** Estructura esquemática de las proteínas Epac. A) Dominios reguladores y catalíticos de Epac1 y de Epac2. B) La activación de la proteína por AMPc causa un cambio conformacional, permitiendo de este modo la interacción con Rap. Redibujado de (Bos 2006).

Las proteínas Epac se expresan en prácticamente todos los tejidos pero ambas isoformas tienen un patrón diferente de expresión y son reguladas durante el desarrollo (Ulucan *et al.*, 2007). El ARN mensajero de Epac1 tiene una distribución amplia pero especialmente abundante en el riñón y el corazón, mientras que Epac2 predomina en el cerebro y la glándula adrenal (Kawasaki *et al.*, 1998). Se ha descrito la interacción de las proteínas Epac con numerosas proteínas: con las proteínas RIM2 y Piccolo (Ozaki *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2002), con la proteína MAP1 (del inglés *Microtubule-Associated Protein 1*, proteína asociada a microtúbulos 1) del citoesqueleto (Borland *et al.*, 2006) con la proteína Ras (Liu *et al.*, 2008). Epac forma parte de complejos multiproteicos de señalización por AMPc dependientes de proteínas de andamiaje AKAP (Sehrawat *et al.*, 2011). Se ha observado una disminución de los niveles de Rab3a en el ratón KO de Epac2 lo que sugiere una interacción entre las dos proteínas (Fernandes *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista farmacológico el AMPc se une con más afinidad a PKA que a Epac por lo que Epac actuaría en un rango de concentraciones de AMPc mayor (Seino y Shibasaki 2005). El activador ortostérico 8-pCpt-2'-O-Me-cAMP activa tanto Epac1 como Epac2 (Rehmann *et al.*, 2008). Se han descrito diversos inhibidores de Epac, aunque sólo ESI-05 parece ser específico (Tsalkova *et al.*, 2012). Respecto a las acciones fisiológicas de la activación de las proteínas Epac se ha demostrado su implicación en procesos de diferenciación y de crecimiento axonal en neuronas de hipocampo a través de la GTPasa Rap1B (Munoz-Llanca *et al.*, 2015) así como en la remodelación sináptica y en la modulación de la neurotransmisión (Laurent *et al.*, 2012). Epac está implicada en la potenciación de la exocitosis en distintos tipos de células y tejidos no neurales como células secretoras de insulina (Kwan *et al.*, 2007), melanocitos de la pituitaria (Sedej *et al.*, 2005) y la reacción acrosómica de los

espermatozoides (Branham *et al.*, 2009). Así mismo, Epac está implicada en la neurotransmisión en regiones del sistema nervioso como el cáliz de Held (Sakaba y Neher 2003; Kaneko y Takahashi 2004; Gekel y Neher 2008) neuronas de corteza cerebral (Huang y Hsu 2006), cerebelo (Ster *et al.*, 2007) e hipocampo (Gelinas *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2015) y en la potenciación por receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la liberación de glutamato en sinaptosomas (Ferrero *et al.*, 2013).

La importancia de Epac en los mecanismos de liberación de neurotransmisor se ha demostrado en el ratón KO de Epac1 y Epac2 (Yang *et al.*, 2012). En las rodajas de hipocampo de este ratón, la ausencia de las dos proteínas, pero no de cada una por separado, disminuye la liberación inducida (EPSCs) y la frecuencia, pero no la amplitud, de la liberación espontánea (mEPSCs). La ausencia de Epac1 y 2 no altera la plasticidad a corto plazo pero anula la plasticidad a largo plazo (LTP) (Yang *et al.*, 2012). De acuerdo con esto se ha descrito que la ausencia de Epac2 muestra deficiencias en la potenciación a largo plazo y en la modulación de la transmisión sináptica por AMPc (Fernandes *et al.*, 2015). En el cáliz de Held la potenciación de la transmisión sináptica inducida por incremento de los niveles de AMPc con forskolina es insensible a los inhibidores de PKA (Sakaba y Neher 2003) y es mimetizada por los activadores de Epac (Kaneko y Takahashi 2004; Gekel y Neher 2008).

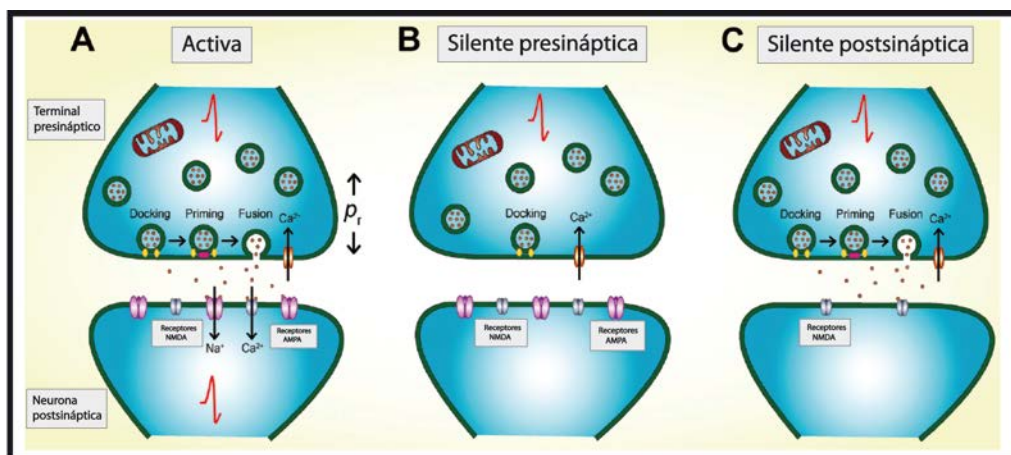
Sin embargo, los mecanismos de señalización de Epac en la potenciación de la liberación de neurotransmisores no se han establecido de manera definitiva. Si bien Epac inhibe canales de  $K^+$  sensibles a ATP (Zhao *et al.*, 2013), muchos de los datos de señalización de Epac se han obtenido en sistemas secretores no neuronales. Así, el aumento de la liberación de neurotransmisor podría ser debida a: la interacción directa de Epac y la activación subsiguiente de la proteína RIM como se ha observado en células secretoras de insulina (Ozaki *et al.*, 2000), la activación de Rab3 (Park *et al.*, 2012) como sugiere la disminución de esta proteína en el KO de Epac2 (Fernandes *et al.*, 2015), la activación de PLC $\epsilon$  a través de la diana de Epac Rap2B (Schmidt *et al.*, 2001; Dzhura *et al.*, 2011) para generar DAG y activar Munc18 a través de la activación de PKC (Hucho *et al.*, 2005; Gekel y Neher 2008) o a la activación de Munc13. Los datos de este laboratorio indican que la potenciación de la liberación de glutamato mediada por el receptor  $\beta$ -adrenérgico en sinaptosomas cerebrocorticales también depende de Epac (Ferrero *et al.*, 2013). Según estos datos el aumento de AMPc proporcionado por el receptor activaría Epac que a su vez activaría PLC promoviendo la hidrólisis de fosfoinosítidos. Esto resultaría en la producción de DAG que su vez activaría/translocaría Munc13-1 a la zona activa. Además, la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico potencia a interacción entre Rab3A y RIM1 $\alpha$  (Ferrero *et al.*, 2013).



En el presente trabajo se ha estudiado la implicación de la proteína Epac en el fenómeno del silenciamiento presináptico inducido por la activación prolongada del receptor CB1 en neuronas granulares de cerebelo.

## 5. Sinapsis silentes

El silenciamiento sináptico es una forma extrema de regulación de la fuerza de la transmisión sináptica que podría tener importantes implicaciones en la plasticidad. Las primeras evidencias de este tipo de comportamiento fueron proporcionadas por estudios de electrofisiología en los que se estudiaba la liberación de neurotransmisor mediante análisis cuantal y en los que se observó que el número de sitios de liberación funcionales no se correspondía con el número de sitios físicos de contacto entre neuronas (Neale *et al.*, 1983; Wojtowicz *et al.*, 1991). Las sinapsis silentes no responden al estímulo y el fenómeno del silenciamiento puede afectar tanto a la célula presináptica como a la postsináptica (Figura I-11).



**Figura I-11.** Tipos de sinapsis silentes. A) Sinapsis activas que liberan neurotransmisor que se une a receptores postsinápticos. B) Sinapsis silentes presinápticas que son incapaces de liberar neurotransmisor. C) Sinapsis silentes postsinápticas que carecen de receptores postsinápticos. Adaptado de (Crawford y Mennerick 2012).

Las sinapsis silentes postsinápticas (Faber *et al.*, 1991; Charpier *et al.*, 1995) son aquellas en las que la liberación de neurotransmisor se produce normalmente pero estas no son capaces de provocar la respuesta de la neurona postsináptica en condiciones de potencial de membrana de reposo, aunque sí cuando la membrana postsináptica está despolarizada (Kerchner y Nicoll 2008). Este hecho se ha relacionado con ausencia de receptores AMPA, cuya activación despolariza la membrana liberando al receptor NMDA de su bloqueo por  $Mg^{2+}$  (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984; Citri y Malenka 2008). La conversión de estas sinapsis silentes postsinápticas en sinapsis activas por incorporación de receptores AMPA a la superficie de la neurona parece estar implicada en la LTP (Isaac *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1995) y el desarrollo (Kerchner y Nicoll 2008).

El silenciamiento presináptico se caracteriza por la incapacidad para liberar neurotransmisor tras la llegada de un potencial de acción a pesar de una entrada de calcio normal y de la existencia de un complemento de proteínas presinápticas similar al de una sinapsis funcional (Cousin y Evans 2011; Crawford y Mennerick 2012). Es importante señalar que una sinapsis silente no debe ser confundida con una sinapsis con una baja probabilidad de liberación, cosa que puede ocurrir si el estímulo aplicado es demasiado débil (Cousin y Evans 2011). Las sinapsis silentes presinápticas no tienen alterada la funcionalidad de los receptores postsinápticos (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006). Los botones sinápticos activos pueden convertirse en silentes cuando se someten a una despolarización crónica (Moulder *et al.*, 2004). Se ha observado que el aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no revierte el silenciamiento (Moulder *et al.*, 2004) porque los botones silenciados muestran una maquinaria de liberación alterada con un tamaño reducido del agrupamiento de vesículas sinápticas listas para la liberación (RRP) y niveles disminuidos de algunas proteínas de la zona activa (Jiang *et al.*, 2010). Dado que en el silenciamiento presináptico por despolarización crónica el cambio observado tiene una polaridad opuesta al estímulo que lo induce, este silenciamiento presináptico podría representar una adaptación de la red neuronal a un incremento sostenido en la excitabilidad. Sin embargo, el silenciamiento presináptico no resulta únicamente de un cambio homeostático ya que esta forma de silenciamiento se puede inducir también por la activación persistente de receptores acoplados a proteínas G que inhiben la liberación de glutamato (Crawford *et al.*, 2011) aunque los receptores de cannabinoides sólo parecen silenciar las sinapsis GABAérgicas (Losonczy *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la reducción en los niveles de AMPc induce el silenciamiento presináptico a la vez que ocluye el silenciamiento inducido por despolarización (Moulder *et al.*, 2008). Este mismo estudio demuestra que el inhibidor del proteasoma MG132 previene la inducción del silenciamiento.

Existen diferentes teorías sobre el significado fisiológico del silenciamiento presináptico. Por un lado, se ha sugerido que podría tener una función protectora frente a una elevada actividad neuronal (Crawford *et al.*, 2012). En el caso de la sinapsis establecida entre la fibra paralela y la célula de Purkinje en el cerebelo el silenciamiento podría estar relacionado con la redistribución de los pesos sinápticos. Hay datos *in vivo* que indican que aproximadamente el 85% de estas sinapsis son silentes (Isope y Barbour 2002) y que el proceso de aprendizaje motor consistiría en dar más peso a unas sinapsis (Dean *et al.*, 2010) que a otras (Porrill y Dean 2008; Dean *et al.*, 2010), por medio de un fenómeno de silenciamiento. El mecanismo del silenciamiento podría tener la ventaja de la menor escala temporal (minutos a horas) en la que opera en comparación con la sinaptogénesis y la remodelación sináptica.

Datos recientes obtenidos en nuestro grupo han mostrado que la exposición prolongada a los agonistas de los receptores CB1 induce el silenciamiento de las sinapsis glutamatérgicas. Así, la incubación de las células granulares con el agonista

cannabinoide HU210 resulta en una inhibición de la respuesta exocitótica global de la preparación celular, que cuando es analizada individualmente en cada uno de los botones sinápticos de estas neuronas, indica la ausencia total de exocitosis en una subpoblación de botones sinápticos. Este silenciamiento parece estar relacionado con una disminución de los niveles a AMPc, aunque es independiente de la actividad de PKA. El análisis de la distribución de las vesículas sinápticas estudiado con microscopia electrónica ha mostrado la retirada de las vesículas sinápticas de las proximidades de la membrana plasmática en la zona activa. Así mismo, se ha observado que esta redistribución de las vesículas sinápticas no tiene lugar en los ratones carentes del receptor CB1.

En este trabajo se ha continuado con el estudio del mecanismo molecular del silenciamiento presináptico inducido por la exposición a agonistas de los receptores de cannabinoides con especial interés en la señalización PKA-independiente iniciada por el receptor y los efectos de esta acción sobre la maquinaria exocitótica de las células granulares.





## **II OBJETIVOS**



## II OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de los mecanismos implicados en el silenciamiento presináptico inducido por la exposición prolongada a agonistas cannabinoides de las células granulares de cerebelo.

Se ha prestado especial interés a la señalización mediada por Epac e iniciada por la activación del receptor CB1 así como a los efectos de esta señalización sobre la maquinaria exocitótica de las células granulares.

Los objetivos concretos son:

1. Identificar alguna de las proteínas de la maquinaria exocitótica determinantes de la susceptibilidad al proceso del silenciamiento.
2. Determinar algunas de las propiedades del silenciamiento presináptico como duración, reversibilidad, inducción mediante diferentes agonistas del receptor CB1 de cannabinoides, etc.
3. Profundizar en el papel de la proteína Epac en el silenciamiento presináptico mediante el uso de técnicas farmacológicas y genéticas.
4. Determinar el papel de la proteína RIM1 en el silenciamiento mediante el uso células granulares procedentes de animales de genotipo salvaje y carentes de la misma.
5. Estudiar los cambios en la distribución de las vesículas sinápticas en relación con la inducción y la prevención farmacológica del silenciamiento.





### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### III MATERIALES Y MÉTODOS

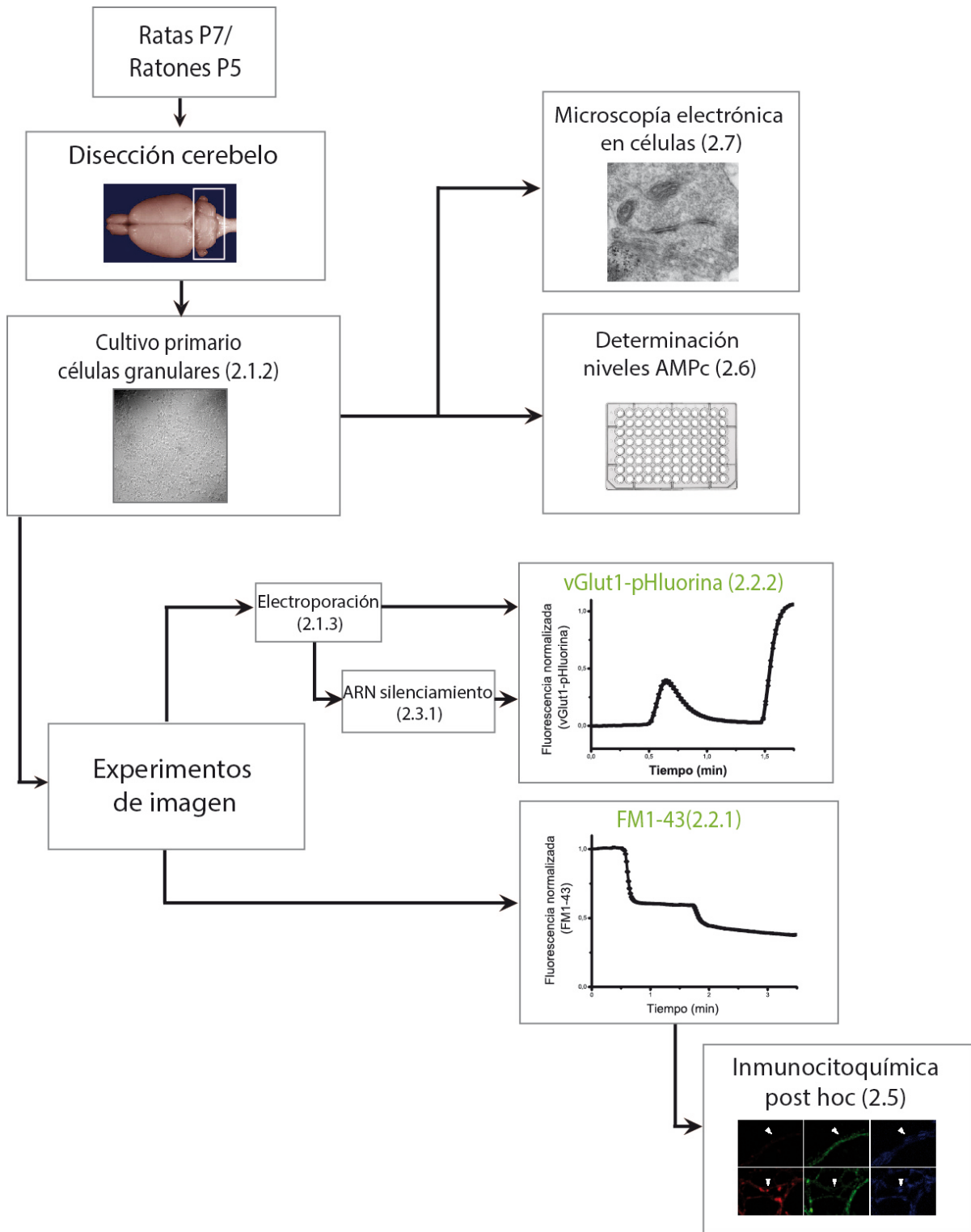
#### 1. Materiales

##### 1.1. Material biológico

Los experimentos de esta Tesis Doctoral se realizaron empleando células granulares de cerebelo de rata. Se utilizaron ratas albinas (*Ratus norvegicus*) de la cepa Wistar de 7 días postnatales. Los animales fueron suministrados por el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid, 1 hora aproximadamente antes de la realización del cultivo, momento hasta el cual permanecieron junto a la madre.

Para algunos de los estudios funcionales se utilizaron ratones (*Mus musculus*) C57/BL6 de cepa salvaje o modificados genéticamente, carentes de la proteína presináptica RIM1 $\alpha$  (Schoch *et al.*, 2002). Estos últimos fueron cedidos por la doctora Susanne Schoch de la Universidad de Bonn. Las colonias de estos ratones se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

Los diferentes procedimientos de manipulación y sacrificio de los animales se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones éticas para la manipulación de animales y la normativa de la Comisión Europea (86/609/ECC). La experimentación animal de los proyectos de investigación que han financiado este trabajo ha sido aprobada por el comité de Experimentación Animal de la UCM.



**Esquema III-1.** Metodología empleada en el presente trabajo para los experimentos con cultivo primario de células granulares de cerebelo de rata y de ratón de genotipo salvaje o carente de la proteína presináptica RIM1 $\alpha$  (con o sin rescate). Entre paréntesis se indica la sección correspondiente con la información detallada de cada una de las técnicas.

## 1.2. Equipos

### 1.2.1. Cultivos y electroporación

Equipo	Casa comercial
Agitador orbital modelo WY-100	Comecta, Barcelona, España
Cabina de flujo laminar PV-30	Telstar; Terrasa, España
Incubador HERAccl®	Thermo Fisher Scientific; NC, EE.UU.
Amara Nucleofector II	Amara Biosystems; Colonia, Alemania

**Tabla III-1.** Equipos utilizados en cultivos y electroporación

### 1.2.2. Adquisición de imagen

Equipo	Casa comercial
Microscopio invertido modelo Eclipse TE-2000S	Nikon; Japón
Objetivo de inmersión en aceite CFI plan Apo VC 60x (NA 1,4)	Nikon; Japón
Cámara CCD modelo iXonEM+DU885	Andor Technology; Belfast, Irlanda
Monocromador	Kinetic Imaging; Nottingham, Reino Unido
Sistema de administración VC6	Warner Instruments; CT, EE. UU.
Termostato de vías TC-344B	Warner Instruments; CT, EE. UU.
Cámara de perfusión modelo PH5	Warner Instruments; CT, EE. UU.
Microscopio JEM1010	JEOL (Tokio, Japón)

**Tabla III-2.** Equipos de adquisición de imagen

### 1.2.3. Genotipado

Equipo	Casa comercial
Termobloque Termomixer Compact	Eppendorf; Hamburgo, Alemania
Termociclador MasterCycler Personal	Eppendorf; Hamburgo, Alemania
Sistema Hoefer miniVe	Amersham Pharmacia; GE Healthcare, Reino Unido
Fuente modelo EPS 601	Amersham Pharmacia; GE Healthcare, Reino Unido
Analizador de imágenes Fluor S Multimager	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hércules, EE.UU.

**Tabla III-3.** Equipos utilizados para el genotipado

### 1.2.4. Acumulación de AMPc

Equipo	Casa comercial
Lector de placas FLUOStar Omega	BMG LabTech; Ottenberg, Alemania

**Tabla III-4.** Equipo utilizado para medir la acumulación de AMPc

### 1.3. Reactivos, anticuerpos y fármacos

#### 1.3.1. Material de cultivos

Producto	Casa comercial	Referencia
Kit de digestión enzimática con papaína	Worthington; Lakewood NJ, EE.UU	PSD2, LK003163
Medio de cultivo Neurobasal A	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU	10888-022
Suplemento de medio de cultivo B-27	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU	17504-044
Suplemento de glutamina de degradación lenta	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU	A12860-01
Solución antibiótica-antimicótica	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU	15240-062
Kit electroporación neuronas rata, rat Nucleofector Kit	Lonza; Basilea, Suiza	VPG-1003
Citosina b-D-arabinofuranósido, inhibidor replicación ADN	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU	C1768
EBSS (Earl's Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU	E6267
Poli-L-Lisina	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU	P4707
Cubreobjetos de vidrio (15mm de diámetro)	Menzel-Gläser (Braunschweig, Alemania)	CB00150RA1

**Tabla III-5.** Material de cultivos

#### 1.3.2. Reactivos y sondas

	Casa comercial	Referencia
Sales	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	-
Sales	Merck-Millipore; Darmstadt, Alemania	-
Sonda FM-43	Invitrogen Life Technologies (CA, EE.UU)	T35356

**Tabla III-6.** Reactivos y sondas

#### 1.3.3. ARN para el silenciamiento de la expresión de proteínas

siARN	Secuencia diana	Casa comercial	Referencia
Epac2 (Acell Rat Rapgef4)	CCCUUGCUUAUUAAGAUUA	Dharmacon	A-101689-11-0020
Epac1 (Acell Rat Rapgef3)	CCAUCAUCCUUCGAGAAAA	Dharmacon	A-095869-17-0005
Control negativo (Non-targeting)	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon	D-001910-01-20
Aplicación siARN		Casa comercial	Referencia
5X siRNA Buffer		Thermo Fisher Scientific	B-002000-UB-100
Acell siRNA Delivery Media		Thermo Fisher Scientific	B-005000-100
Extracción de ARN		Casa comercial	Referencia
RNeasy Plus Mini Kit		Qiagen Iberia S.L., Madrid	74134
Retrotranscripción		Casa comercial	Referencia
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit		Applied Biosystems	4368814

**Tabla III-7.** Reactivos para el silenciamiento de la expresión de proteínas

## 1.3.4. Genotipado

Extracción ADN	Casa comercial	Referencia
kit Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega; Madison, EE.UU.	A2361
Proteinasa K	Promega; Madison, EE.UU.	M8305
Polimerasa termoresistente	Promega; Madison, EE.UU.	M8305
PCR	Casa comercial	Referencia
Cebador 1774	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	SY130539064-53
Cebador 1773	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	SY130539064-54
Cebador 1808	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	SY130539049-070
Cebador 676	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	SY130539049-071
Electroforesis	Casa comercial	Referencia
Agarosa	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	A9539
SYBR Safe	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	4309155
Escalera de 100 pb	Real Durviz; Paterna, Valencia, España	RBMM2

**Tabla III-8.** Reactivos utilizados en el genotipado

## 1.3.5. Fármacos utilizados en imagen y microscopía electrónica de células

Los fármacos utilizados para los tratamientos en los diferentes experimentos se consiguieron como se detalla a continuación:

Compuesto	Función	Casa comercial	Referencia
Forskolina	Activador AC	Calbiochem; CA, EE.UU.	344270
H-89	Inhibidor PKA	Calbiochem; CA, EE.UU.	371962
8-p-Cpt-2'-Me-O-Camp	Activador Epac	BioLog; Bremen, Alemania	C041
ESI-05	Inhibidor selectivo Epac2	BioLog; Bremen, Alemania	M-092
SQ-22536	Inhibidor AC	Merck-Millipore; Darmstad, Alemania	568500
U-73122	Inhibidor PLC	Merck-Millipore; Darmstad, Alemania	662035
HU-210	Agonista CB1R	Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido	966
WIN 55,212-2 mesylate	Agonista CB1R	Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido	1038
2-Arachidonylglycerol	Agonista endógeno CB1R	Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido	1298
JZL 184	Inhibidor MAGL	Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido	3836
(-)-Isoproterenol hydrochloride	Agonista $\beta$ -AR	Sigma-Aldrich; MO, EE.UU.	I6504

**Tabla III-9.** Fármacos utilizados en imagen y microscopía electrónica de células

## 1.3.6. Acumulación de AMPc

Producto	Casa comercial	Referencia
Kit cAMP dynamic 2	CisBio; Codolet, Francia	62AM4PEB
IBMX (inhibidor fosfodiesterasas de AMPc y GMPc)	Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.	I5879

**Tabla III-10.** Reactivos usados para medir la acumulación de AMPc



## 1.3.7. Inmunodetección

Anticuerpos Primarios	Especie huésped	Concentración	Casa comercial	Referencia
anti-CB1	cobaya	1-300	Frontier Institute Co. Ltd;Hokkaido, Japón	CB1-GP-Af530
anti-Munc13	ratón	1-1000	Synaptic Systems; Goettingen, Alemania	12611
anti-RIM	conejo	1-400	Synaptic Systems; Goettingen, Alemania	14003
anti-Bassoon	cobaya	1-500	Synaptic Systems; Goettingen, Alemania	141004
anti-vGlut1	conejo	1-500	Synaptic Systems; Goettingen, Alemania	135302
anti-Rab3	ratón	1-1500	Synaptic Systems; Goettingen, Alemania	107111
Anticuerpos Secundarios	Especie huésped	Concentración	Casa comercial	Referencia
Alexa 488 anti-ratón	burro	1-200	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	A21202
Alexa 488 anti-conejo	burro	1-200	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	A21206
Alexa 594 anti-ratón	burro	1-200	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	A21203
Alexa 594 anti-conejo	burro	1-200	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	A21207
Alexa 594 anti-cobaya	cabra	1-200	Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	11076
Otros			Casa comercial	Referencia
Suero normal de cabra (bloqueo uniones inespecíficas)			Jackson ImmunoResearch; PA, EE.UU.	005-000-121
Suero normal de burro (bloqueo uniones inespecíficas)			Jackson ImmunoResearch; PA, EE.UU.	017-000-121
Líquido de montaje Prolong Antifade con DAPI (marcage núcleos)			Invitrogen, Life Technologies; CA, EE.UU.	P36935
Portaobjetos de vidrio (26 x 76mm)			Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania	AD00000112E

**Tabla III-11.** Reactivos y anticuerpos usados para inmunodetección

## 1.3.8. Microscopía electrónica en células

Compuesto	Función	Casa comercial	Referencia
OsO <sub>4</sub>	Fijador de microscopía electrónica	Electron Microscopy Sciences; PA, EE. UU.	19170
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Aumenta contraste	Merck MA; EE.UU.	104971
Glutaraldehído grado I	Fijador de microscopía electrónica	Sigma-Aldrich; MO, EE. UU.)	G5882
Kit de resinas SPURR®	Inclusión de muestras	TAAB; Berkshire, Reino Unido	S024D

**Tabla III-12.** Reactivos utilizados en microscopía electrónica de células

## 1.4. Medios

## 1.4.1. Cultivo primario de células granulares de cerebelo

Medio I	
Compuesto	Concentración
Papaína	12,5 U/ml
DNAsa	600 U
CaCl <sub>2</sub>	2,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,4 mM

**Tabla III-13.** Composición del medio I

Medio II	
Compuesto	Concentración
Ovomucoide	10mg/ml
DNAsa	400 U
CaCl <sub>2</sub>	2,4mM
MgCl <sub>2</sub>	2,4mM

Tabla III-14. Composición del medio II

Compuesto	Concentración
Solución antibiótica-antimicótica 100x	1% (v/v)
Suplemento de medio de cultivo B-27 50x	2% (v/v)
Suplemento de glutamina de degradación lenta 100x	1% (v/v)
KCl	25 mM

Tabla III-15. Composición del medio de cultivo Neurobasal suplementado

## 1.4.2. Imagen en célula viva

Para la realización de los experimentos de imagen se utilizaron medios HBM (del inglés *Hepes Buffer Medium*) de lavado con baja concentración de KCl (5mM) y de estimulación con alta concentración de KCl (50mM), cuya composición se detalla a continuación. Para los experimentos con vGlut1-pHluorina además se utilizó HBM con amonio para alcalinizar el interior de las vesículas sinápticas. Todos los medios fueron atemperados a 37°C y su pH ajustado a 7,4.

HBM	LAVADO	ESTIMULACIÓN	AMONIO
Compuesto	Concentración (mM)		
NaCl	140	95	90
KCl	5	50	5
NaHCO <sub>3</sub>	5	5	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	1,2	1,2
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1
CaCl <sub>2</sub>	-	1,33	-
Glucosa	10	10	10
HEPES	10	10	10
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	50

Tabla III-16. Composición de los medios HBM

#### 1.4.3. Silenciamiento de genes

Compuesto	Concentración
Solución antibiótica-antimicótica 100x	1% (v/v)
Suplemento de medio de cultivo B-27 50x	2% (v/v)
KCl	25 mM

**Tabla III-17.** Composición del medio suplementado

Compuesto	Volumen por tubo (μl)
Tampón Taqman RT 10X	5
Mezcla dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dUTP) 25X	2
Cebadores aleatorios 10X	5
Transcriptasa inversa MultiScribe 50U/ul	2,5

**Tabla III-18.** Reactivos para la reacción de retrotranscripción

Compuesto	Volumen por tubo (μl)
Mezcla TaqMan Universal 2X	10
Sonda primers Epac2/GAPDH	1
Agua libre de ARNasas	4
Producto de la RT diluido 1/2	5

**Tabla III-19.** Reactivos para la reacción de RT-PCR

#### 1.4.4. Inmunocitoquímica post-hoc

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	27
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18

**Tabla III-20.** Composición PBS

#### 1.4.5. Genotipado de ratones

Compuesto	Volumen por tubo (μl)
Solución de lisis de núcleos	200
EDTA 0,5M pH 8,0	50
RNAse A (10mg/ml)	5
Proteinasa K (20mg/ml)	20

**Tabla III-21.** Composición mezcla de digestión

Compuesto	Volumen por tubo (μl)
Agua libre nucleasas	10,3
5x Green GoTaq Buffer	4
Mezcla nucleótidos PCR	0,4
MgCl <sub>2</sub>	1,2
Cebadores: 1774	0,5
1773	0,5
1808	0,5
676	0,5
Polimerasa GoTaq (U/μl)	1,9
ADN genómico	2

**Tabla III-22.** Mezcla de reacción de la PCR

Compuesto	Concentración (mM)
Tris	40
Acetato	20
EDTA (pH 8-8,4)	1

**Tabla III-23.** Composición TAE

#### 1.4.6. Microscopía electrónica en células

Tampón	Composición	
	Compuesto	Concentración (%)
Millonig (tampón fosfato 0,1M); pH 7,3	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,87 (p/v)
	NaOH	0,38 (p/v)
Fijación I	Paraformaldehído	4
	Glutaraldehído	2,5
Fijación II (Osmicación)	OsO <sub>4</sub>	1,0
	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1,5

**Tabla III-24.** Composición de los tampones y fijadores

## 2. Métodos

### 2.1. Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo de rata y ratón

#### 2.1.1. Preparación de las placas

Para favorecer la adhesión celular a las placas, en los tratamientos con siARN para silenciamiento y en la determinación de niveles de AMPc, o a los cubreobjetos en los experimentos de imagen, estos materiales se trataron con poli-L-lisina. En el segundo caso el procedimiento fue el siguiente:

- Tratar los cubreobjetos con HCl 1,5M durante 20 minutos para facilitar la adhesión de la poli-L-lisina
- Lavar los cubreobjetos 3 veces con agua desionizada estéril y dejar secar
- Cubrir cada uno de los cubreobjetos con 100µl de poli-L-lisina 0,1 mg/ml
- Incubar durante 3 horas a 37°C
- Lavar 3 veces con agua desionizada, colocar 3 cubreobjetos por pocillo en placas de 6 pocillos y dejar secar

En el caso de las placas para los tratamientos con ARN de silenciamiento (placas de 6 pocillos) y para la determinación de los niveles de AMPc (placas de 96 pocillos) el procedimiento fue el mismo excepto que el tratamiento con HCl 1,5M se omitió.

### 2.1.2. Protocolo del cultivo

El método usado se basa en una extracción enzimática con papaína y purificación en gradiente con el inhibidor de papaína conjugado con BSA (ovomucoide). El procedimiento fue el siguiente:

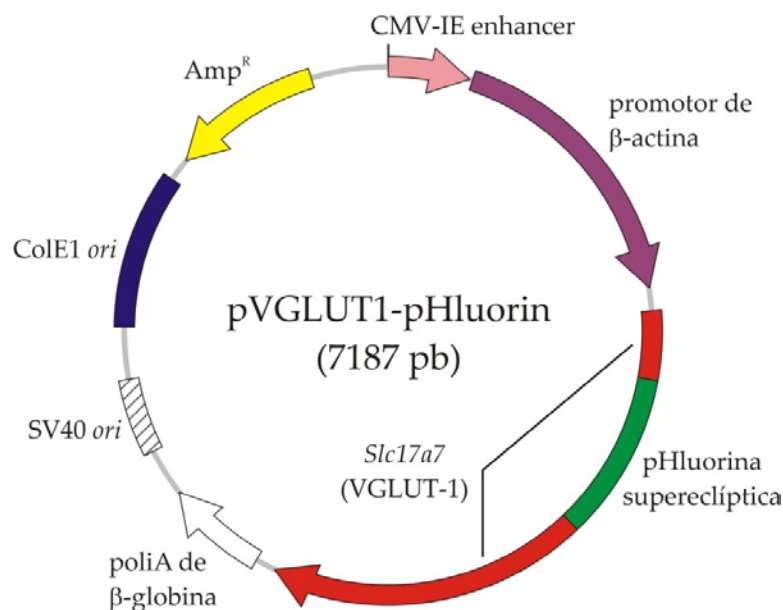
- Sacrificio de los animales por decapitación y extracción del cerebelo en EBSS frío
- Limpieza de los cerebelos de elementos no cerebelosos, meninges y vasos sanguíneos en EBSS frío. Este proceso, así como todos los siguientes se llevaron a cabo en campana de flujo laminar
- Disgregación mecánica con tijeras de cirugía de los cerebelos en medio I (Tabla III-13) y transferencia de los mismos a un tubo de 50 ml con el mismo medio
- Digestión enzimática durante 50 min a 37°C, 250 rpm. Disgregación de los restos no digeridos mediante pases por pipeta automática de 10 ml
- Centrifugación a 1000 rpm en centrífuga de radio de 9,8cm, durante 5 min a 20°C
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en el medio II (Tabla III-14). Repartir el contenido entre dos tubos de 15ml agitados previamente
- Centrifugar a 1100 rpm durante 5min a 20°C
- Retirar el sobrenadante, eliminando en primer lugar la espuma formada y resuspender las células en medio de cultivo suplementado (Tabla III-15), previamente atemperado a 37°C
- Preparar una dilución 1/10 de las células en medio de cultivo y diluir 1/2 en azul de Tripán al 0,5% (factor de dilución total 20)
- Contaje de las células en una cámara de Neubauer. Se contaron únicamente las células vivas, que son aquellas capaces de excluir el colorante
- La densidad celular se obtiene con la ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \text{n}^{\circ} \text{ células contadas} \times \text{factor dilución} \times 10^4$$

- Siembra de las células a las siguientes densidades:
  - $1 \times 10^6$  células / pocillo para las placas de 6 pocillos (ARN de silenciamiento)
  - $1 \times 10^6$  células / placas de 96 pocillos (determinación AMPc)
  - $1-3 \times 10^5$  células/cubreobjetos de 15mm de diámetro (imagen de fluorescencia en célula viva, inmunocitoquímica, microscopía electrónica)
- Cambio del medio a las 24h. Para evitar la proliferación de la glía se añade citosina arabinofuranósido a una concentración final de  $10 \mu\text{M}$ .

### 2.1.3. Electroporación y transfección

Para la realización de los experimentos de imagen con vGlut1-pHluorina, los cultivos de células granulares de cerebelo se transfectaron con el plásmido correspondiente a ODIV. Este plásmido contiene una versión modificada de la GFP altamente sensible a cambios de pH, y que codifica también para el transportador vesicular de glutamato de tipo 1, así como una región de resistencia a la ampicilina (Figura III-1). Este plásmido fue cedido amablemente por el doctor Robert Edwards de Universidad de California, San Francisco (Voglmaier *et al.*, 2006).



**Figura III-1.** Esquema del plásmido vGlut1-pHluorina empleado para transfectar a las células granulares de cerebelo a ODIV. El esquema es cortesía del Dr. D. Bartolomé-Martín.

Con las células granulares obtenidas en el cultivo se procedió de la siguiente forma:

- Separar de la suspensión celular  $4-5 \times 10^6$  de células en tubos eppendorf de 1,5ml. Dejar reposar durante 10min
- Centrifugar durante 2min a 2000 rpm en microfuga con radio de 5,5 cm
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 100µl de Rat Neuron Nucleofector Solution. Es importante evitar la formación de burbujas. Añadir 1µg del plásmido vGlut1-pHluorina y esperar 10 min.
- Transferir la mezcla a una cubeta de electroporación y electroporar con el programa O-003
- Añadir inmediatamente después 500µl de medio de cultivo atemperado a 37°C y trasladar la mezcla a un eppendorf de 1,5 ml. Dejar reposar 10-15 min en el incubador.
- Sembrar sobre 1 ml de medio de cultivo añadido previamente a la placa
- Después de dos horas añadir 1,5 ml de medio más en cada pocillo.
- Cambiar el medio de cultivo a las 24 horas, sin añadir en este caso citosina arabinofuranósido
- A 4DIV reemplazar 2ml de medio/pocillo por medio nuevo

La transfección se llevó a cabo tanto en células granulares de rata, como de ratón de genotipo salvaje o carente de la proteína RIM1 $\alpha$ . En este último caso algunas células además fueron transfectadas con el plásmido pCMV-RIM1 $\alpha$  con el fin de rescatar la función de la proteína.

## 2.2. Experimentos de imagen

En los experimentos para estudiar la dinámica del ciclo vesicular de las células granulares de cerebelo en cultivo se emplearon dos tipos de técnicas: la sonda FM1-43 y la transfección con la proteína recombinante vGlut1-pHluorina.

### 2.2.1. FM1-43

Las sondas de tipo FM1 fueron empleadas por primera vez en los años 90, revolucionando el estudio fisiológico de los terminales sinápticos, debido a que permiten la visualización del ciclo de las vesículas sinápticas en células vivas.

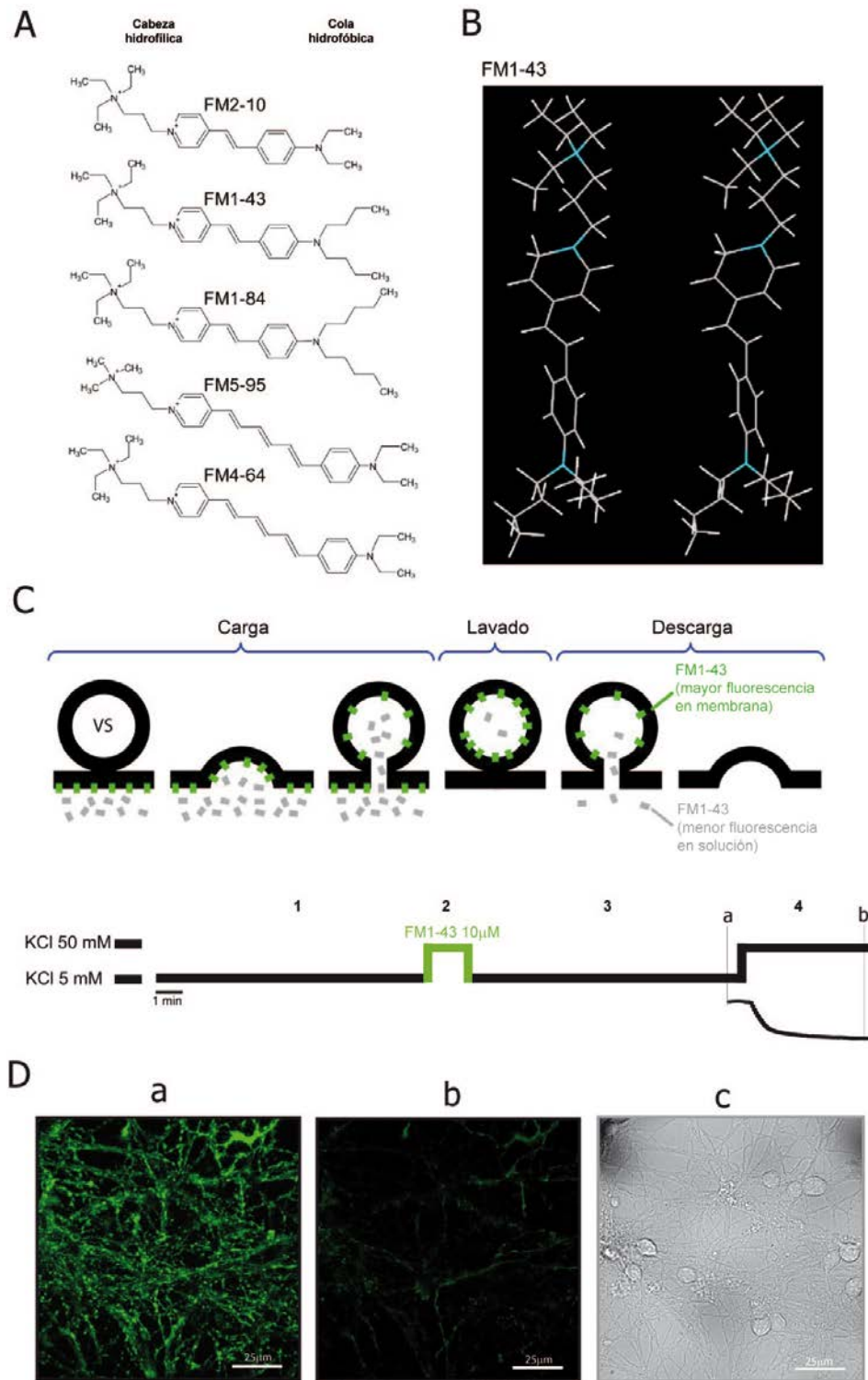
La sonda FM1-43 y sus derivados son sondas anfipáticas de tipo estirilo. Poseen una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica que permite su partición en las membranas biológicas y en el citosol, respectivamente (Figura III-2A). Su interacción con las bicapas lipídicas es reversible y la velocidad de partición está determinada por la longitud de la cadena hidrocarbonada de manera que cuanto mayor es esta menor

es la velocidad de partición. Las sondas estirilo prácticamente no presentan fluorescencia cuando se encuentran en solución acuosa, en cambio en contacto con membranas su fluorescencia aumenta significativamente. Estas dos propiedades son la razón por la cual este tipo de sondas ha sido ampliamente usado para monitorizar el ciclo de las vesículas sinápticas dependiente de actividad.

Para la incorporación de la sonda es necesaria la estimulación previa de las neuronas para que tenga lugar la exposición del interior vesicular al medio extracelular donde se encuentra la sonda (Figura III-2C). La exocitosis se induce mediante la perfusión de medio con alta concentración de potasio. La sonda se incorpora en la capa lipídica interna de la vesícula donde queda atrapada tras la endocitosis compensatoria que tiene lugar después. Así, la sonda atrapada en las vesículas unida a los lípidos de la membrana vesicular emitirá fluorescencia. La sonda también se une a la membrana plasmática de la célula pero este exceso de sonda se elimina mediante lavado. De modo que se puede ver un marcaje fluorescente punteado en el cultivo celular (Figura III-2D a), que representa la sonda de las vesículas de los botones sinápticos. Mediante un segundo estímulo se puede observar la disminución de la fluorescencia debida a la exposición del interior vesicular al medio extracelular y a la partición de la sonda a dicho medio extracelular. De este modo se puede cuantificar la respuesta exocitótica, por la disminución de la fluorescencia. El procesamiento informático de las imágenes permite analizar la disminución de la fluorescencia en las regiones sinápticas. Así en un campo de células se pueden llegar a estudiar cientos de sinapsis de manera individual. Los únicos inconvenientes que presenta esta técnica es que requiere la estimulación de las neuronas antes del experimento y que no permite observar varios ciclos repetidos de las vesículas sinápticas.

En el presente trabajo se utilizó la sonda FM1-43 (Figura III-2B), cuyas longitudes de onda de excitación se encuentran entre los 480 y los 490nm, y su emisión se encuentra por encima de los 510nm (verde). Se empleó un filtro FITC (Fluoresceína IsoTioCianato) que recoge longitudes de onda entre 520 y 540nm.





**Figura III-2.** Estructura y protocolo de uso de las sondas FM. A) Estructura química de las sondas FM. Se pueden ver las cabezas hidrofílicas en la parte de la izquierda y colas hidrofóbicas a la derecha. Las sondas FM2-10, FM1-43 y FM1-84 emiten fluorescencia verde, mientras que FM5-95 y FM6-64 emiten en el rojo. B) Estructura molecular de FM1-43, una de las sondas FM1 más ampliamente usadas. En azul se representan los átomos de nitrógeno C) Protocolo experimental usado para la sonda. Primero las células se atemperan en el medio HBM (1). Posteriormente se procede a la carga de las mismas con la sonda FM1-43 10  $\mu$ M durante 1 min y medio (2). El proceso de lavado elimina el exceso de sonda unido a la membrana externa (3) y por último se procede a la realización del experimento (4), partiendo de una situación de máxima fluorescencia (a) que se apaga tras la estimulación de la exocitosis mediante KCl 50 mM (b). D) Imágenes representativas de un campo después de la carga y el lavado de la sonda (a), la posterior descarga (b) y de contraste de fases (c). Adaptado de (Iwabuchi *et al.*, 2014).

**Protocolo experimental FM1-43**

Los experimentos se realizaron siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- Atemperar las células con HBM de bajo potasio (Tabla III-16) durante 10min a 37°C. Dado que las células han sido cultivadas en medio Neurobasal suplementado este paso es necesario antes de la estimulación con alto potasio
- Incubar las células en medio de estimulación (Tabla III-16) con 10 $\mu$ M FM1-43 durante 1 minuto y medio
- Lavar el cubreobjetos en HBM de lavado
- Montar el cubreobjetos en la cámara de perfusión (PH5, Warner Instruments) y conectar al sistema de perfusión (37°C, 1ml/min). Lavar durante 10min para quitar el exceso de sonda
- Empezar la adquisición de imágenes. En este trabajo las condiciones de adquisición fueron las siguientes:

Objetivo: 60x

$\lambda$  excitación: 479nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición: 0,067 segundos

Ganancia electrónica: 50

Pre-Amplificación de la ganancia: 3,80

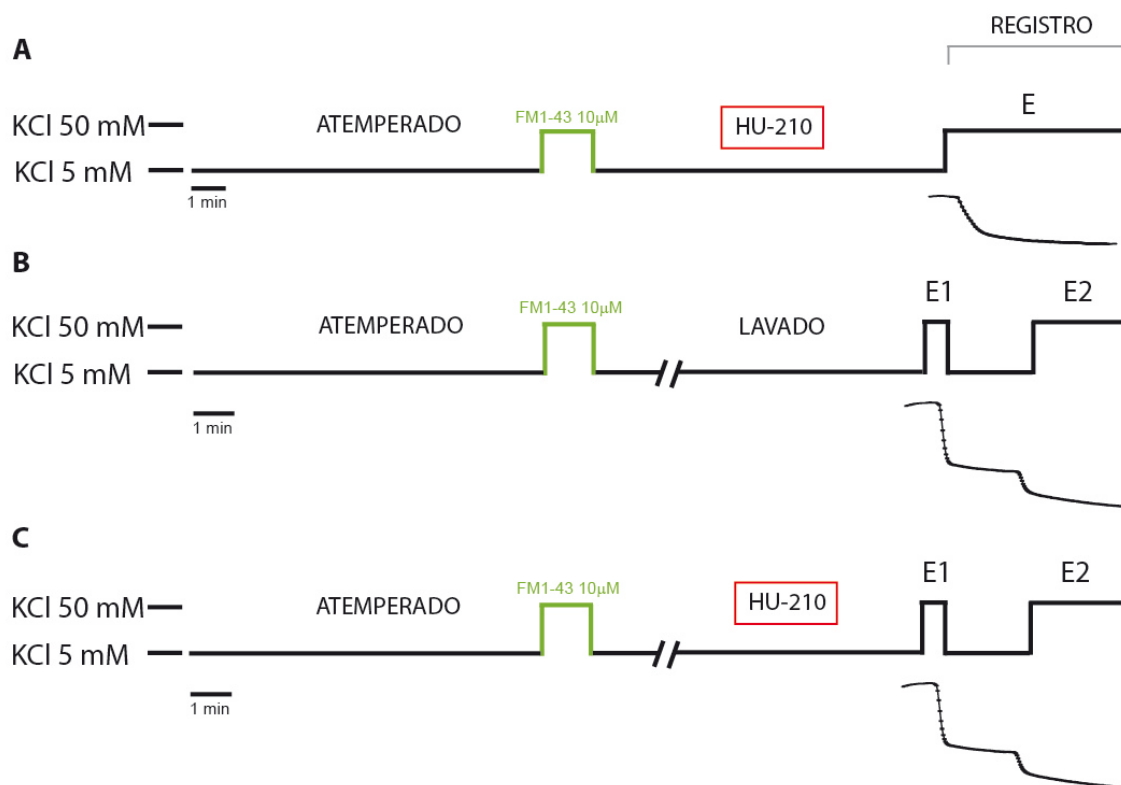
Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 1Hz

Los protocolos empleados fueron diferentes según el experimento (Figura III-3). Cada registro consta de una línea base de mínimo 20seg y la posterior perfusión de HBM de alto potasio.

Al finalizar el registro se toma una imagen de contraste de fases para localizar los puntos fluorescentes correspondientes a botones sinápticos y excluir los de las regiones no sinápticas.

En el apartado de Resultados se detallan los protocolos específicos usados en los diferentes experimentos.



**Figura III-3.** Esquema de los protocolos empleados para los experimentos de FM1-43. Experimentos de uno A) o de dos pulsos B) y C). Las neuronas granulares son atemperadas durante 10min, después de lo cual son sometidas a una primera ronda de estimulación en presencia de FM1-43 10μM. Posteriormente se deja un periodo de lavado para eliminar el exceso de sonda durante el cual las células fueron tratadas con el agonista cannabinoide HU-210 (A). Después del lavado del exceso de sonda se procede al registro del experimento y a la segunda ronda de estimulación (E) durante 10seg. En los experimentos de doble pulso las estimulaciones con KCl 50mM fueron de 10seg (E1) y de 2min (E2) dejando un periodo de lavado de 1min entre ambas. En algunos experimentos en el periodo de lavado las células fueron tratadas con HU-210 C).

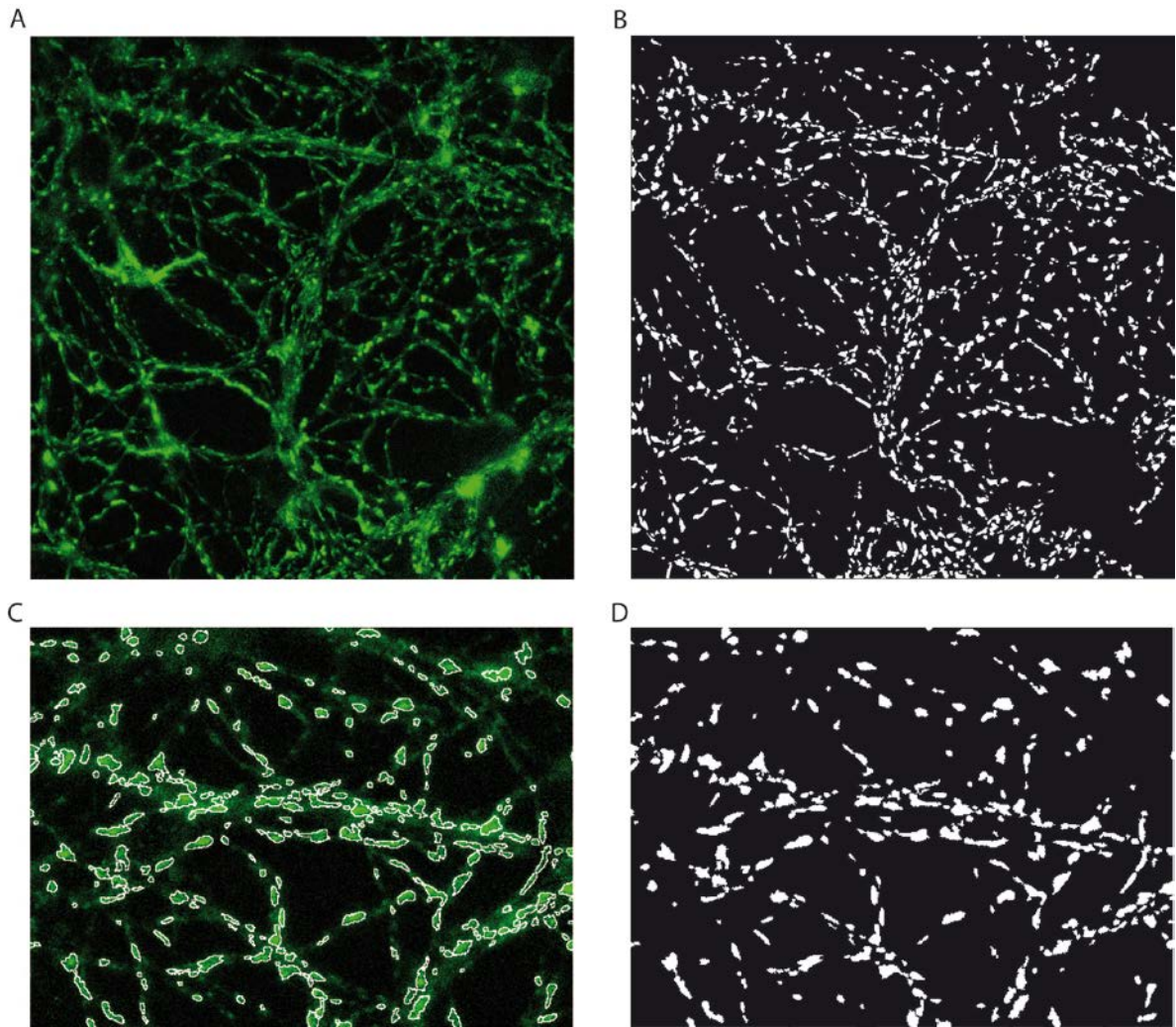
#### Obtención de los datos y procesamiento informático

Las regiones sinápticas se determinaron de manera semi-automática siguiendo el método de Bergsman con ligeras modificaciones (Bergsman *et al.*, 2006; Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Ramirez-Franco *et al.*, 2013). Este método tiene en cuenta tres características para la determinación de las regiones sinápticas: la estabilidad de la señal antes del estímulo (tasa de descarga basal), el ruido de la señal (relación señal/ruido) y el grado de descarga en respuesta a la estimulación.

Mediante el programa IgorPro 6.31 y a partir del registro del experimento se obtuvo una máscara binaria de las regiones sinápticas (Figura III-4), que se usó para la extracción de los valores numéricos de los niveles de fluorescencia. Además el programa automáticamente realizó la sustracción del fondo de las imágenes para su procesamiento posterior. De este modo se obtuvieron valores de fluorescencia crudos o en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (A.U.F). Posteriormente los datos se normalizaron al valor de fluorescencia inicial o máximo (Microsoft Excel).

A continuación se detalla el procedimiento en forma de protocolo:

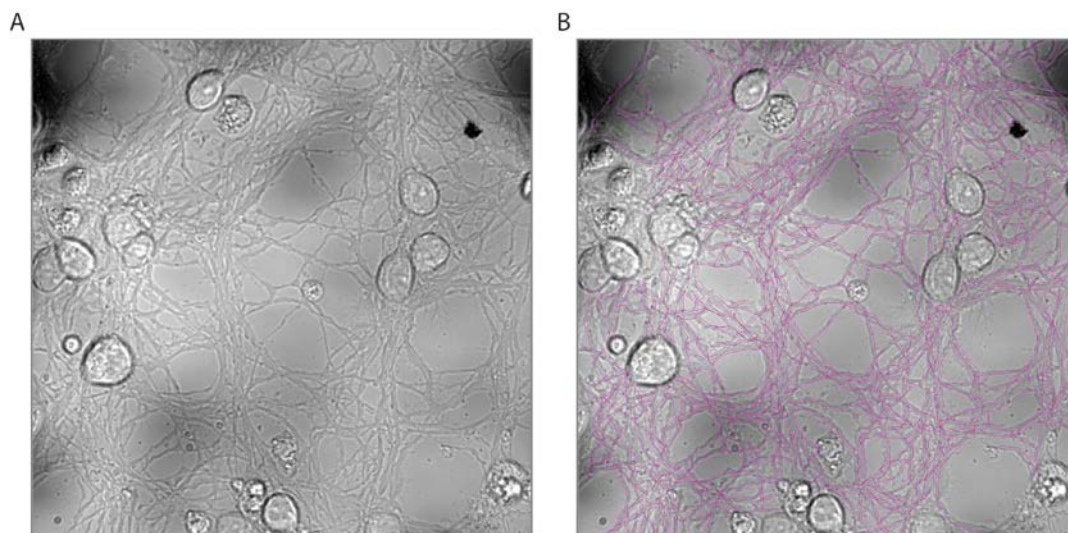
- Guardar las imágenes obtenidas en el experimento en archivo con formato \*.tiff. Descomponer en una secuencia de imágenes individuales en una carpeta junto con la imagen de contraste fases (renombrada como cel.tif).
- Determinar a partir del experimento los valores mínimos y máximos de fluorescencia, el mínimo y máximo área en píxeles de las regiones de interés, del mismo modo que dos regiones estables antes y después de la descarga
- Ejecutar la macro BatchImageProcess en IgorPro 6.31 y elegir la opción “leave folder alone” una vez terminado el procesamiento. Así se guarda una copia del experimento con el fondo sustraído mediante una estrategia basada en el rolling ball (Sternberg 1983). En este paso es importante eliminar artefactos o restos celulares marcados con la sonda que no sean sinapsis.
- Acceder a Data>Browse waves>Quality segment cover y guardar una copia. El archivo que se genera tiene formato \*.ibw y contiene la máscara binaria que se utiliza para analizar el experimento.
- Abrir el programa ImageJ e importar las imágenes procesadas File>Import>Raw en 16 bits, teniendo en cuenta todas las imágenes en la carpeta. Importar también la máscara binaria obtenida en el paso anterior en 8 bit (Figura 11B). Sobre la imagen que aparece ejecutar Process>Binary>Make binary. A partir de esta imagen se generan las regiones de interés (ROIs, del inglés *Regions of Interest*), a través de Analyze>Analyze particles. Guardar el ROIset.zip que se genera.
- Ejecutar sobre la secuencia de imágenes importadas junto con la máscara de los ROIs More>Multimeasure. Se obtiene los valores de fluorescencia en unidades arbitrarias de cada una de las regiones de la máscara. Copiar los datos en un archivo de Origin 8.0
- Normalizar los datos obtenidos al valor de fluorescencia inicial (valor máximo) en Microsoft Excel y representar en Origin 8.0. Los valores de fluorescencias iniciales no fueron normalizados.



**Figura III-4.** A) Imagen de un campo de células granulares cargadas con FM1-43 previa a la realización del experimento. B) Máscara binaria obtenida con IgorPro 6.31 en el mismo campo. C) Detalle del campo con la máscara superpuesta. Se puede ver como las regiones de la máscara delimitan perfectamente los botones sinápticos. D) Detalle de la máscara en la zona ampliada en C).

A partir de los datos normalizados se determinaron las cinéticas de las respuestas, el grado de descarga de FM1-43 y en algunos casos la constante de decaimiento (Origin 8.0). Para algunos experimentos también fueron analizadas las fluorescencias iniciales de los botones sinápticos. En otros también se determinó la densidad de botones sinápticos (número de botones por  $\mu\text{m}$  de fibra). Para ello, sobre la imagen de contraste de fases se trazaron todas las fibras del campo con el *plug-in* "Neuron J" del programa ImageJ (Meijering *et al.*, 2004) (Figura III-5B). Posteriormente se determinó la longitud total de todas las fibras del campo en  $\mu\text{m}$  mediante la misma herramienta. Y por último el número total de botones del campo fue dividido entre la longitud total de los axones.





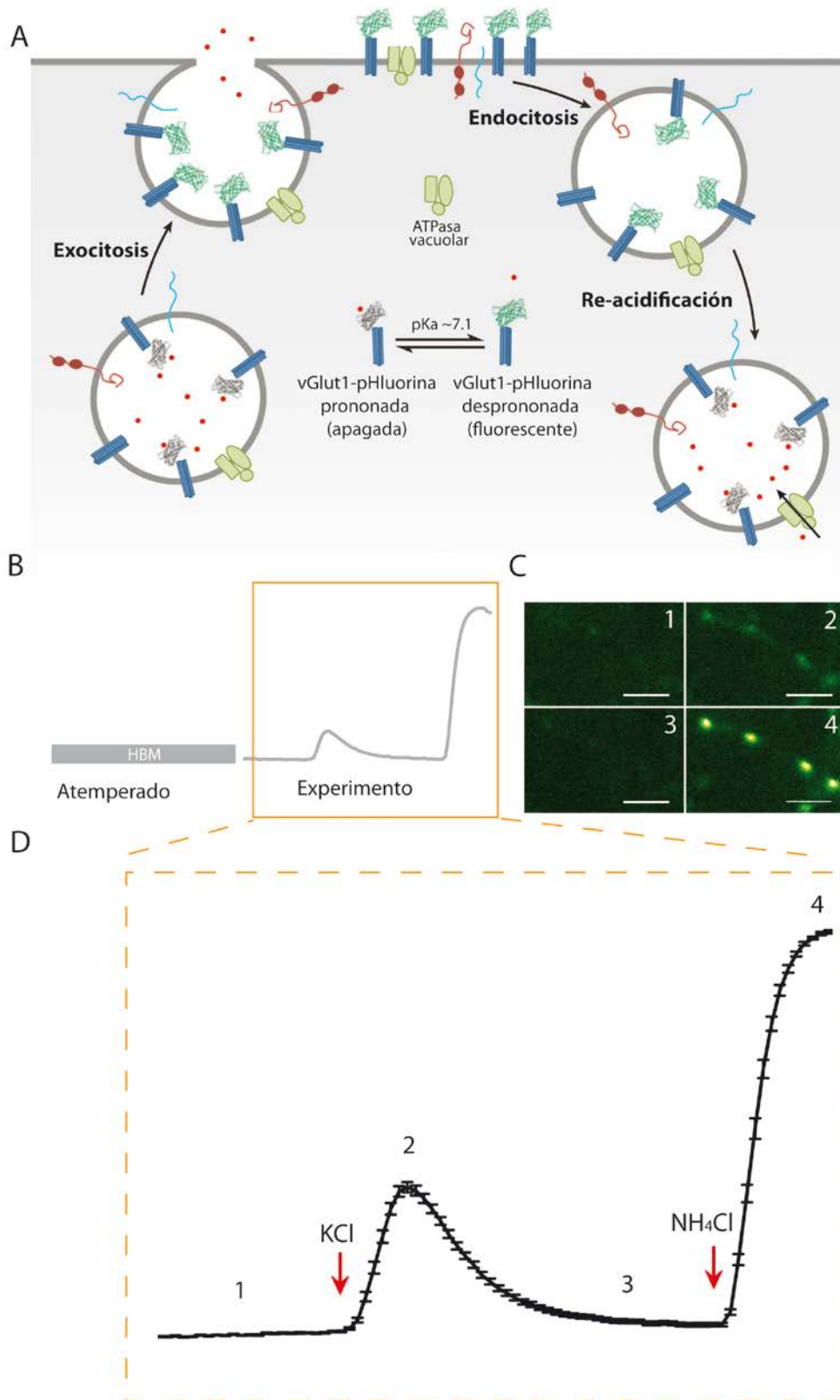
**Figura III-5.** A) Imagen de contraste de fases obtenida tras experimento con FM1-43. B) Trazos de las fibras de todo el campo dibujadas con el *plug-in* "Neuron J".

### 2.2.2. vGlut1-pHluorina

Otra técnica empleada para la monitorización del ciclo de las vesículas sinápticas fue la sonda codificada genéticamente vGlut1-pHluorina. Las pHluorinas son versiones de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) con una alta sensibilidad al pH que fueron diseñadas por Miesenböck (Miesenböck *et al.*, 1998). A continuación esta GFP fue modificada presentando sólo un máximo del espectro de emisión de fluorescencia, llamándose pHluorina eclíptica (Sankaranarayanan y Ryan 2001). Posteriormente se sustituyó la GFP por la EGFP (del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*) y esto llevó a la pHluorina supereclíptica (Ng *et al.*, 2002). La pHluorina que se ha usado en este trabajo corresponde a una pHluorina supereclíptica situada entre los bucles 1 y 2 intraluminales del transportador vesicular de glutamato del tipo 1, conocida como vGlut1-pHluorina (Voglmaier *et al.*, 2006; Balaji y Ryan 2007). Las pHluorinas no emiten fluorescencia a pH ácidos (Figura III-6A, B), como los que se alcanzan en el lumen de las vesículas sinápticas ya que se encuentran en estado protonado. En cambio, cuando están expuestas a un pH de 7,4, durante la exocitosis como consecuencia de la exposición del lumen vesicular al medio extracelular, estas proteínas emiten fluorescencia. Después de la endocitosis y la posterior re-acidificación de las vesículas la fluorescencia se vuelve a apagar. De este modo se puede visualizar el ciclo exo- endocitótico durante repetidas estimulaciones como un incremento transitorio de la fluorescencia tras cada estímulo, correspondiendo la fase ascendente de la fluorescencia a la exocitosis y la caída de la misma a la endocitosis y re-acidificación de las vesículas. Para obtener la señal fluorescente de todas las vesículas del terminal sináptico se perfunde  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM (Tabla III-16), provocando así una alcalinización química del interior de las vesículas. El

amoníaco se encuentra en equilibrio con los iones amonio en solución difunde a través de las membranas atrapando los protones y elevando el pH vesicular (Roos y Boron 1981). Esta señal máxima sirve para normalizar las respuestas obtenidas tras cada estímulo.

De este modo en estado basal las células tienen una fluorescencia baja, seguida por un aumento de la misma cuando se induce la exocitosis con una alta concentración de potasio. Durante la endocitosis que sigue se observa un descenso gradual de la fluorescencia debido a la acumulación de protones por la ATPasa vacuolar. Posterior a la perfusión de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM la fluorescencia aumentará rápidamente para dar lugar a la señal máxima observada (Figura III-6C). Esta técnica permite la observación del ciclo vesicular sin la estimulación previa de las neuronas a diferencia de lo que ocurre con la sonda FM1-43.



**Figura III-6.** Estudio del ciclo vesicular mediante vGlut1-pHluorina. A) La vGlut-pHluorina en el interior de las vesículas sinápticas ( $pH \approx 5,5$ ) se encuentra apagada, la exocitosis permite el contacto de la pHluorina con el medio extracelular ( $pH \approx 7,4$ ), lo que provoca la emisión de fluorescencia por parte de la misma. Durante la endocitosis y re-acidificación de las vesículas la fluorescencia se va apagando gradualmente hasta llegar a la situación de partida. Adaptado de (Dittman y Ryan 2009). B) Esquema general de los experimentos de vGlut1-pHluorina ampliado en (D). Aspecto de una región de un campo (C) y de un registro (D) durante las diferentes fases del experimento: 1) reposo o línea base, 2) exocitosis, 3) endocitosis y 4) alcalinización química.



**Protocolo experimental vGlut1-pHluorina**

- Atemperar las células en HBM de bajo potasio (5mM, Tabla III-16) durante 10min a 37°C
- Montar el cubre con las células en la cámara de perfusión y conectar al sistema de perfusión (37°C, 1ml/min). Montar en la pletina del microscopio. Perfundir HBM de bajo potasio
- Para buscar un campo adecuado se eligieron zonas con alta densidad de fibras y se corroboró la presencia de botones sinápticos que expresaban vGlut1-pHluorina mediante la perfusión durante 5seg con NH<sub>4</sub>Cl 50mM (Tabla III-16). Una vez enfocados los botones se dejó un periodo de lavado de 2min.
- Empezar la adquisición de imagen. En este caso las condiciones de adquisición fueron las siguientes:

Objetivo: 60x

λ excitación: 475nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición: 0,250 segundos

Ganancia electrónica: 100

Pre-Amplificación de la ganancia: 3,80

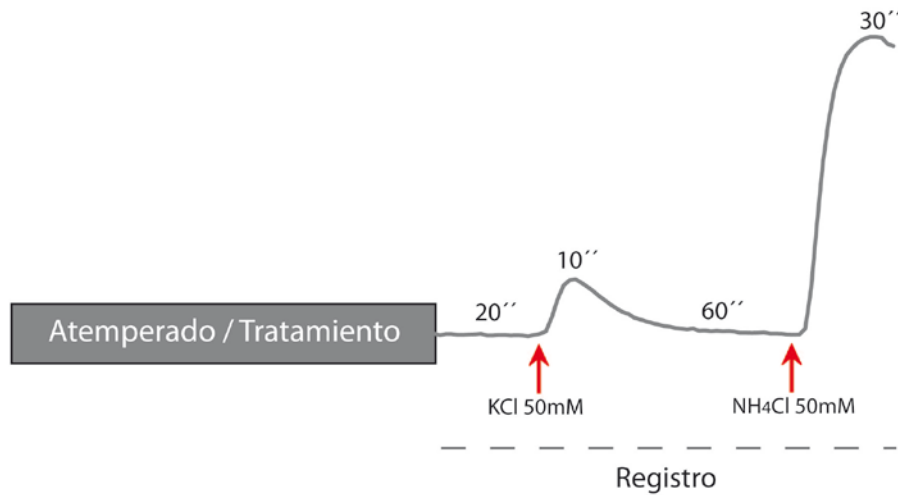
Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 4Hz (las 4 imágenes se promediaron para mejorar la relación señal ruido) dando lugar a una tasa real de aproximadamente 1Hz.

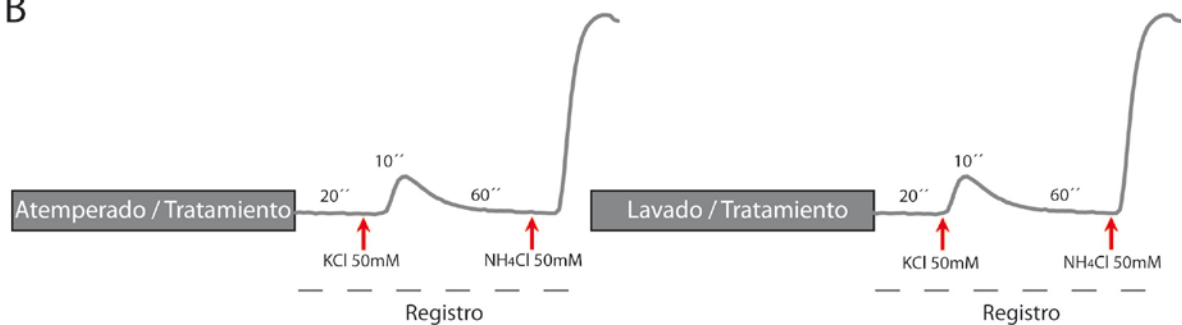
Los protocolos empleados fueron diferentes según el experimento (Figura III-7). Cada registro consta de una línea base de al menos 20seg y la posterior perfusión de HBM de alto potasio (50mM, Tabla III-16) durante 10seg. Normalmente el tiempo de recuperación después de la estimulación fue de un minuto. Posteriormente se perfundió el NH<sub>4</sub>Cl 50mM durante 30seg para obtener la señal máxima.

Al finalizar el registro se toma una imagen de contraste de fases para verificar la correspondencia entre la señal fluorescente y la presencia de botones sinápticos, así como la exclusión de regiones no sinápticas.

A



B



**Figura III-7.** Protocolos gráficos empleados para las células transfectadas con vGlut1-pHluorina. Experimentos de uno (A) y de dos pulsos (B). A) En primer lugar las células se dejan atemperar en HBM de lavado y en su caso se les aplica el tratamiento farmacológico. Posteriormente se procede a registrar el experimento que consta de línea base (20''), una estimulación de 10'', un periodo de reposo de 1 min seguido por último de la aplicación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM. B) Cada uno de los pulsos tiene los mismos pasos que (A), entre ambos pulsos hay un periodo de lavado durante el cual también pueden ser aplicados diferentes fármacos y durante el cual no se registra el experimento.

### Obtención de datos y procesamiento informático

En este caso la selección de regiones sinápticas se hizo de manera manual con el programa ImageJ, teniendo en cuenta las regiones fluorescentes después de la perfusión del  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . De ese modo se creó una máscara binaria para la extracción de los valores crudos de fluorescencia.

El procedimiento se detalla a continuación:

- Abrir el experimento con el programa ImageJ y seleccionar manualmente las regiones de interés, que son las que se iluminan después de la perfusión de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Restaurar la selección en un documento en blanco de las mismas dimensiones (Edit>Selection>Restore selection; Edit>Draw; Edit>Fill) y generar una máscara binaria (Process>Binary>Make binary) y el ROIset correspondiente (Analyze>Analyze particles).

- Siguiendo el mismo procedimiento generar una máscara del fondo, eligiendo 3 regiones del campo del experimento libres de células
- Sacar los valores crudos de fluorescencia (More>Multimeasure) en UAF tanto de las regiones de interés, como del fondo.

Para representar los valores se les sustrajo el fondo (Origin 8.0) y además a cada botón sináptico se le restó su propia línea base para así conferir a la misma el valor 0 (Microsoft Excel). Por último los valores de cada botón fueron normalizados a su máximo valor de fluorescencia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Así se podía medir la fracción de vesículas puesta en marcha tras un estímulo determinado.

En los experimentos en los que se estudiaba el porcentaje de botones silentes fue elegido un umbral del 4% de respuesta respecto al  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que corresponde a los niveles de ruido en nuestro sistema.

### 2.3. Silenciamiento del gen de Epac2 con siARN

Con el fin de determinar el papel del factor de intercambio de nucleótidos de guanina activado por AMPc (Epac2) en el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides se realizaron experimentos con siARN para interferir con la expresión del gen de Epac2. Se utilizó el siARN Acell Rat Rapgef4 con la siguiente secuencia como diana del ARNm del gen: CCCUUGCUUAUAAAAGAU. Como control negativo se usó un siARN de secuencia aleatoria (en inglés *non-targeting siRNA*) con la siguiente secuencia diana: UGGUUUACAUGUCGACUAA. En experimentos preliminares se utilizó también siARN contra Epac1 (Acell Rat Rapgef3), con la secuencia: CCAUCAUCCUUCGAGAAAA.

#### 2.3.1. Tratamiento

El siARN se añadió al cultivo a 4DIV y se mantuvo durante 72h, dado que los experimentos de imagen y la extracción del ARN se realizaban a 7DIV. Se utilizó un medio comercial que facilita la entrada del tratamiento en las neuronas (Acell Delivery Media) con varios suplementos (Tabla III-17). La concentración final del siARN fue de 1 $\mu\text{M}$  tanto en el caso de Epac1 como en el de Epac2. En los pocillos no tratados el medio Neurobasal también fue sustituido por el medio comercial suplementado.

#### 2.3.2. Extracción del ARN

Para realizar la extracción del ARN se utilizó un kit comercial de Quiagen (RNeasy Plus Mini Kit) cuyo fundamento radica en la capacidad de unión del ARN a una membrana de sílice en presencia de una concentración elevada de sales. De este modo

los ARN de más de 200 nucleótidos se unen a la columna quedando excluidos los ARN5, 8S y 5S. Con ese fin se siguió el siguiente protocolo:

- Realizar dos lavados con PBS 1x a temperatura a 37°C para eliminar restos celulares
- Levantar las células con 500µl con tampón desnaturante con guanidina isotiocianato para inactivar las ARNasas y β-mercaptoetanol (10µl/ml), y pasarlas a un eppendorf estéril. Para homogeneizar las células se realizan varios pases por una jeringa de 1 ml con aguja de 20-G (0,9mm de diámetro)
- Pasar el contenido homogeneizado a una columna que elimina el DNA genómico y centrifugar 30seg a 10.000 rpm con microfuga con radio de 5,5cm. Descartar la columna
- Añadir al sobrenadante 1 volumen de etanol al 70% (500µl) para conseguir las condiciones apropiadas para la unión del ARN. Realizar varios pases con la pipeta para mezclar bien
- Transferir el contenido a la columna de unión del ARN y centrifugar 15seg a 10.000 rpm con microfuga con radio de 5,5cm. Descartar el sobrenadante
- Añadir 500µl de buffer de lavado, centrifugar durante 15seg a 10.000rpm con microfuga de radio de 5,5cm, descartar el sobrenadante y volver a centrifugar la columna en las mismas condiciones para asegurarse de eliminar todo el etanol
- Eluir el ARN añadiendo 30µl de agua libre de ARNasas a la columna y centrifugando durante 1min a 10.000 rpm con microfuga con radio de 5,5cm. Repetir el proceso con el eluido para aumentar el rendimiento.

### 2.3.3. Retro transcripción y reacción en cadena de la polimerasa

Dada la inestabilidad del ARN monocatenario, una vez terminada su extracción se procedió inmediatamente a la obtención del ADN complementario mediante transcripción inversa o retrotranscripción. De nuevo se hizo uso de un kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) que utiliza una mezcla de cebadores de ocho nucleótidos con secuencias generadas al azar para iniciar la síntesis de la hebra de ADN complementario. Para la transcripción inversa se usaron 10µl del ARN obtenido en la extracción en un volumen total de 50µl (Tabla III-18).

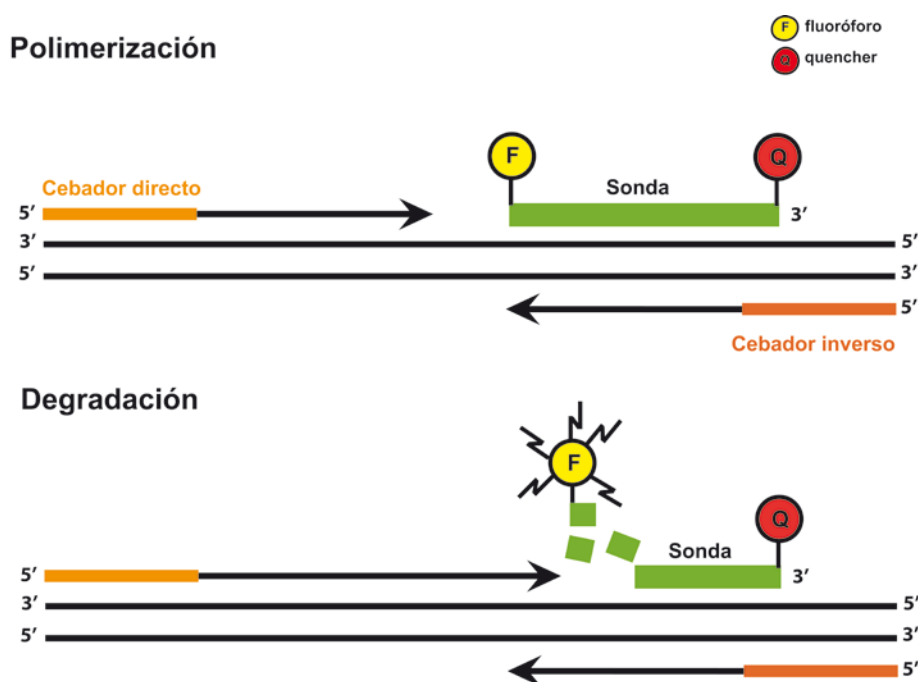
Las condiciones usadas para la reacción se resumen en la siguiente tabla:

	1er ciclo	2º ciclo	3er ciclo	4º ciclo
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Duración	10 min	120 min	5	∞

**Tabla III-25.** Condiciones retrotranscripción

Durante la realización del presente trabajo los anticuerpos para marcaje de las proteínas Epac1 (Ref. sc-28366, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y Epac2 (Ref.sc-28326, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) no dieron un resultado satisfactorio. Por esa razón la cuantificación de la expresión de ambas en condiciones control y después de un tratamiento de silenciamiento se llevó a cabo midiendo los niveles de ARN mensajero. Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) que permite detectar la aparición de un producto mientras la reacción en cadena de la polimerasa se está desarrollando. De este modo, se mide la cantidad de amplicón producido en cada ciclo de PCR.

En el presente estudio se utilizaron las sondas Taqman MGB que consisten en oligonucleótidos de 18-22 pares de bases que en el extremo 5' llevan acoplado un fluoróforo y en el 3' un sistema para el apagado de la fluorescencia (en inglés *quencher*). Esta técnica usa la propiedad exonucleasa de la Taq Polimerasa, que permite la hidrólisis del fluoróforo separándolo del sistema de apagado de la fluorescencia, y produciendo un aumento de la misma. Durante la PCR la sonda se une específicamente a la región complementaria y la polimerasa replica a partir del lugar donde la sonda se ha unido. La actividad exonucleasa 5' degrada la sonda liberando el fluoróforo de la proximidad del *quencher*, aumentando de este modo la fluorescencia. Este proceso se repite durante los ciclos de la PCR (Figura III-8).

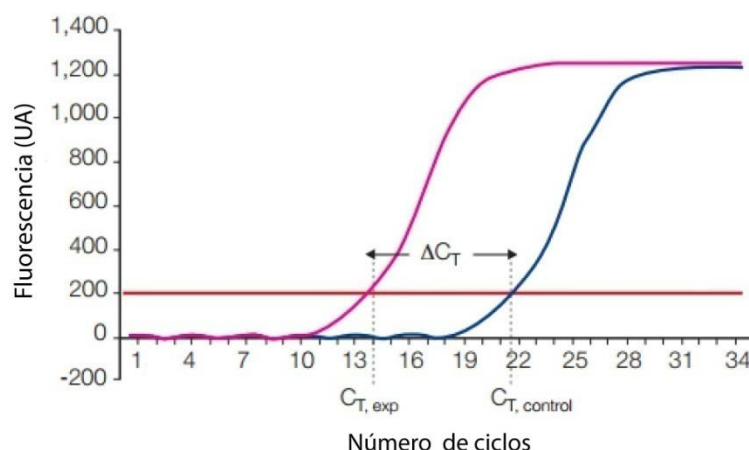


**Figura III-8.** Esquema del método de extensión catalizado por la Taq polimerasa. Se puede observar el extremo 5' de la sonda marcado con el fluoróforo y el 3' con el *quencher*. A medida que la polimerasa va degradando la sonda el *quencher* es separado del fluoróforo de modo que este último empieza a emitir fluorescencia. Redibujado de Yuan *et al.*, 2000.

De este modo los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan

dicha fluorescencia respecto al número de ciclos (Figura III-9). La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN iniciales y debe alcanzar una determinada concentración umbral, para que la fluorescencia detectada sea significativamente diferente a la basal. Esta concentración se alcanza al empezar la fase exponencial de la reacción, dónde la eficiencia de la PCR es máxima. Así se determina el valor umbral o "*threshold*" que permite calcular el ciclo umbral ( $C_T$ ) de cada uno de los amplicones para la cuantificación posterior del ARN mensajero. De este modo en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores, dando lugar a un valor de  $C_T$  inferior.

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo o control endógeno, cuya expresión no varía en las condiciones del experimento. En este caso el gen de referencia elegido fue el de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de rata. Los fluoróforos usados fueron VIC (4,7,2'-triclono-7'-fenil-6-carboxifluoresceína) para la GAPDH (Ref. 4352338E) y FAM (6-carboxifluoresceína) para Epac2 unidos a los cebadores de los respectivos genes.



**Figura III-9.** Ejemplo teórico de curvas de amplificación tras una RT-PCR. Se pueden ver los valores de  $C_T$  de dos muestras. La diferencia entre ambas ( $\Delta C_T$ ) refleja la diferencia en el número relativo de copias de ARNm en cada una.

Las reacciones de la RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l por pocillo (Tabla III-19). Las placas se llevaron al Centro de Apoyo a la Investigación en la Unidad de Genómica de la UCM, donde se realizaron las medidas de la RT-PCR.

## 2.4. Inmunocitoquímica post-hoc

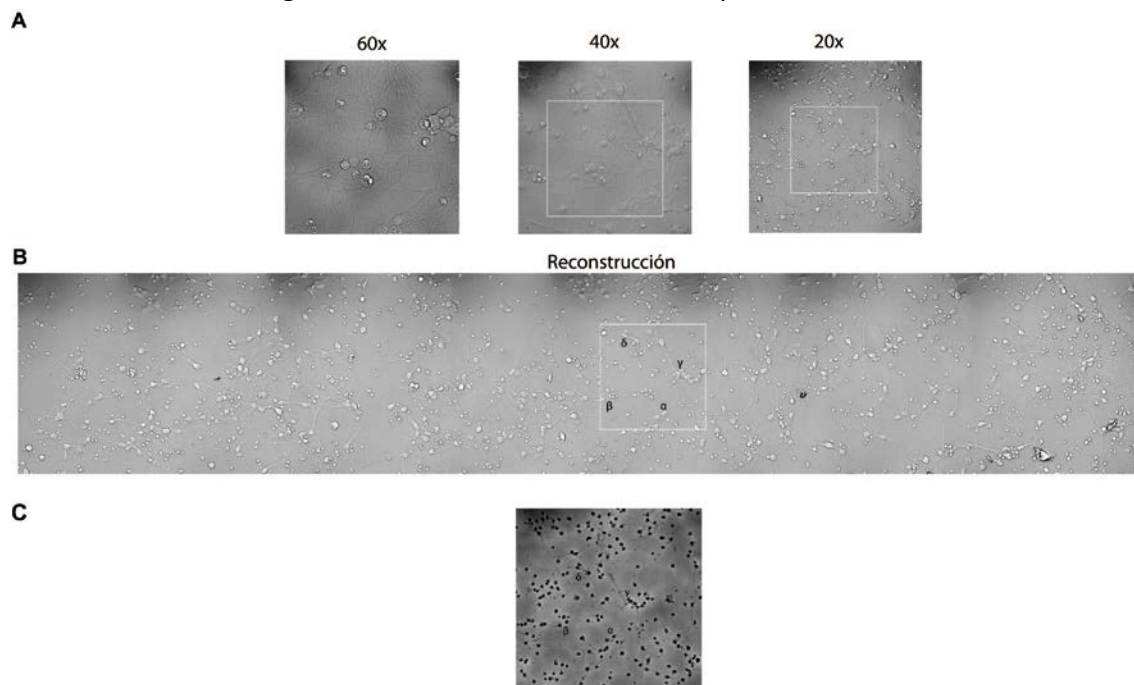
Esta técnica permite relacionar la funcionalidad de los botones sinápticos con el nivel de expresión de determinadas proteínas. Para ello, se realiza primero el

experimento funcional con FM1-43 y posteriormente se procede a realizar un experimento de inmunocitoquímica convencional (Ramírez-Franco *et al.*, 2013). La identificación y superposición de la imagen funcional y de inmunocitoquímica permite relacionar la función presináptica con el contenido proteico.

#### 2.4.1. Procedimiento

- Realizar el experimento de imagen con FM1-43 siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 2.2.1.1.
- Después de tomar la imagen en contraste de fases a 60x, se realizan varias imágenes más a menores aumentos (40x y 20x), siempre intentado identificar el campo donde se realizó el experimento. Las imágenes tomadas a un aumento bajo permiten la reconstrucción del máximo área posible del cubreobjetos. Las marcas que se forman en ocasiones en el cubreobjetos pueden ser de gran utilidad a la hora de localizar los campos estudiados.
- Limpiar con etanol los restos de aceite del cubreobjetos en la parte inferior de la cámara de perfusión. Desmontar cuidadosamente la cámara y recuperar el cubreobjetos con las células
- Realizar un lavado rápido en PBS (Tabla III-20) atemperado a 37°C durante 5min para eliminar restos celulares
- Fijar las células con paraformaldehído al 4% en PBS (p/v) durante 15min a 4°C
- Lavar con PBS frío (dos veces)
- Permeabilizar con PBS-TritonX100 al 0,2% (v/v) durante 6min a temperatura ambiente. Este paso permite que los anticuerpos puedan acceder al interior celular
- Lavar con PBS
- Bloquear con una solución de PBS-TritonX100 al 0,05% (v/v) 10% de suero de cabra y burro, en función del animal en el cual esté generado el anticuerpo primario, durante 1h a 37°C. De este modo disminuyen las uniones inespecíficas
- Incubar con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Los anticuerpos se incuban en una solución de PBS-TritonX100 al 0,05% (v/v), 5% suero de cabra y de burro
- Lavar con PBS-TritonX100 al 0,1% (v/v) (tres veces)
- Incubar con los anticuerpos secundarios durante 1h a 37°C. Todos los anticuerpos secundarios empleados en este estudio estaban conjugados con fluoróforos Alexa y se usaron a una dilución de 1:200
- Lavar con PBS (tres veces) y enjuagar con agua ultrapura para eliminar el exceso de sales
- Montar sobre un portaobjetos con medio de montaje ProLong con DAPI, asegurándose de no formar burbujas durante el proceso

- Con la ayuda de la reconstrucción de las imágenes de menor aumento encontrar el campo del experimento en 20x.
- Una vez encontrado el campo pasar al 60x e intentar alinear lo mejor posible el cubreobjetos a su posición durante el experimento funcional. Posteriormente tomar las imágenes de fluorescencia contra las proteínas de interés.



**Figura III-10.** Inmunocitoquímica post hoc. A) Imagen en contraste de fases a diferentes aumentos después de un experimento de FM1-43. Se puede ver el campo del experimento marcado en blanco. C) Imagen del campo encontrado en 20x después de la inmunocitoquímica. Con letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  están marcadas células de referencia encontradas en las diferentes imágenes.

#### 2.4.2. Obtención de datos y procesamiento informático

El procesamiento del experimento de FM1-43 se hizo según se explica en la sección 2.2.1.2. Posteriormente se sustrajo el fondo de las imágenes de inmunocitoquímica (herramienta *Rolling Ball* del programa ImageJ) y se alinearon con la primera imagen del experimento de FM1-43 mediante el *plug-in* "Align RGB planes" del programa ImageJ. Una vez alineados ya se puede usar la máscara del experimento de FM1-43 para extraer los valores de inmunorreactividad. Estos valores fueron normalizados a la media de inmunorreactividad de todos los botones del mismo cubreobjetos. De forma arbitraria se segregaron tres grupos: botones cuyo valor de inmunorreactividad era inferior a 0,5, siendo 1 el valor medio; botones cuyo valor de inmunorreactividad era superior a dos veces la media; y por otro lado la población total. Los botones pertenecientes a cada grupo se seleccionaron sin tener en cuenta sus cinéticas individuales y se representó la respuesta promedio de cada uno de estos



grupos. Así los botones fueron clasificados a ciegas según su contenido en la proteína de interés y posteriormente relacionados con su nivel de descarga.

## 2.5. Genotipado de los ratones carentes de la proteína RIM1 $\alpha$

El genotipado de los ratones carentes de RIM1 $\alpha$  se hizo a partir de trozos de cola de aproximadamente 0,5-1,2cm de las crías de 2-3 días de edad. En el caso de los ratones adultos la extracción de material genético se hizo a partir de trozos de oreja.

Para el aislamiento del ADN se hizo uso de un kit comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System, Promega), con el siguiente protocolo:

- Digerir las muestras en tubos Eppendorf con mezcla de digestión (Tabla III-21) toda la noche a 55°C, 300rpm
- Centrifugar los tubos durante 5min a 8000 rpm a temperatura ambiente
- Transferir el sobrenadante a tubos nuevos, añadir 250 $\mu$ l de tampón de lisis y mezclar con vórtex
- Pasar la mezcla a las columnas del kit y centrifugar durante 5min a 13.000rpm con microfuga de radio de 5,5cm para conseguir la unión del ADN genómico al filtro de la columna
- Descartar el sobrenadante y añadir 650 $\mu$ l de la solución de lavado de etanol al 60% y centrifugar 1 min a 13.000rpm (cuatro veces). Centrifugar una vez más a la misma velocidad durante 3 min para eliminar cualquier traza de etanol
- Transferir las columnas a nuevos Eppendorf y eluir el ADN con 250 $\mu$ l agua libre de nucleasas previamente calentada a 65°C. Esperar 2min y centrifugar durante 1min a 13 000rpm. Para aumentar el rendimiento transferir el eluido de nuevo a la columna y repetir el proceso

El ADN aislado se amplificó mediante PCR, usando los siguientes cebadores:

	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (Jorquera <i>et al.</i> , )
Banda WT	1774	GGGAGGCAGAGCATCATGAGAGACTG	0,7
	1773	GCTTCACTTGCGCTGCATATCTCAC	
Banda KO	1808	CAACTGTGGCTGTGCACACTTGCCG	0,3
	676	GAGCGCGCGCGCGGAGTTGTTGAC	

**Tabla III-26.** Características cebadores KO RIM1 $\alpha$

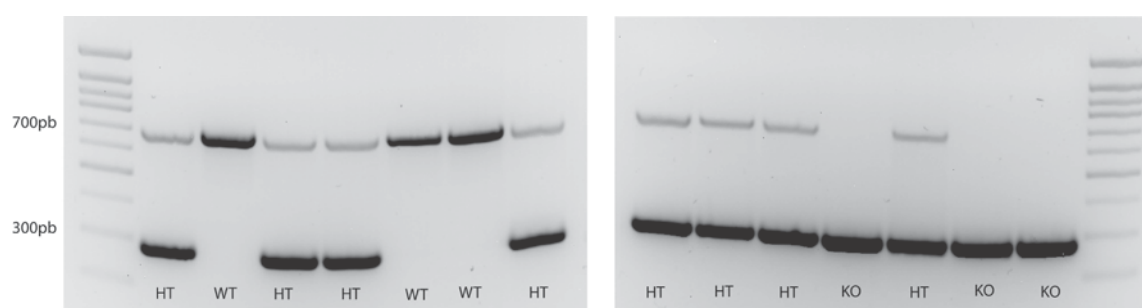
Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 $\mu$ l tal (Tabla III-22).

Las condiciones para la amplificación en el termociclador fueron las que se indican a continuación:

	1er ciclo	2º ciclo	3er ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Temperatura	95°C	94°C	62°C	72°C	72°C	4°C
Duración	5 min	1 min	1 min	1 min	7 min	∞
30 ciclos						

**Tabla III-27.** Condiciones de la PCR

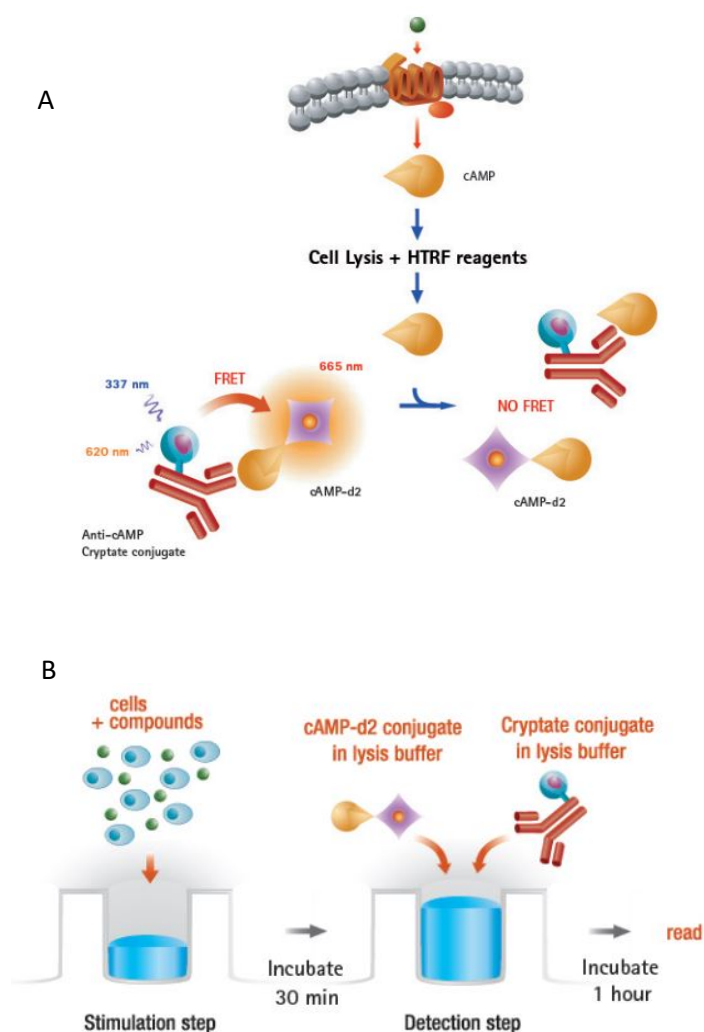
Para resolver las bandas amplificadas en la PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE 1X (Tabla III-23) a un voltaje constante de 90V. El producto amplificado se tiñó con SYBR Safe y visualizó posteriormente con el analizador de imágenes FluorS de Bio-Rad.



**Figura III-11.** Gel de agarosa resultado del genotipado de ratones. Se pueden ver dos bandas de distinto tamaño. La superior de 700 pb corresponde al alelo salvaje (Newton *et al.*, ) y la inferior de 300 pb del alelo mutante (KO). Con HT están indicados los animales que tenían un alelo de cada o heterocigotos

## 2.6. Acumulación de AMPc

El ensayo de AMPc se realizó con el kit comercial cAMP dynamic 2 HTRF (del inglés *Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*, fluorescencia de alta resolución temporal), basado en la tecnología FRET (transferencia de energía de resonancia). Este método se basa en la transferencia de energía entre un cromóforo donador, un anticuerpo anti-AMPc conjugado con el fluoróforo criptato de europio, y un cromóforo aceptor, un análogo de AMPc conjugado con el fluoróforo d2. Es un ensayo competitivo entre el AMPc producido por las células y el análogo de AMPc marcado con la sonda aceptor d2. La unión del análogo de AMPc al anticuerpo anti-AMPc marcado con criptato emite energía que excita a la sonda d2 y se transfiere energía en la franja de los 665nm de longitud de onda. El AMPc endógeno producido por la célula competirá con el análogo de AMPc unido a la sonda d2 en su unión al anticuerpo y esto reducirá la señal de transferencia. De este modo la señal observada es inversamente proporcional a la concentración de AMPc de la muestra (Figura III-12A).



**Figura III-12.** A) Fundamento de la técnica del kit comercial usada para medir los niveles de AMPc. B) Resumen del protocolo empleado: las células son tratadas durante 30min; a continuación se añaden los componentes del kit y se procede a la lisis de las mismas; por último se realiza la lectura a 620 y 665nm tras 1h de incubación.

Se utilizaron células granulares de 9DIV en placas de 96 pocillos. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Lavar las células con HBM de lavado (ver Tabla III-16)
- Incubar durante 30min con los fármacos disueltos en HBM de lavado con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX (1mM). Las concentraciones de los fármacos usados y los tiempos de tratamiento usados en cada caso se especifican en el apartado de Resultados.
- Añadir los compuestos indicados en cada pocillo tal y como se indica en el kit. En algunos de los pocillos se añaden cantidades conocidas de AMPc para obtener una recta patrón. En dos de los pocillos se añade únicamente tampón de estimulación, uno para determinar el fondo (blanco) y otro para determinar la señal de FRET máxima. Posteriormente se añade el tampón de lisis con el anticuerpo contra AMPc marcado con criptato en todos los pocillos, excepto el

destinado a blanco que sólo lleva tampón de lisis. En todos los pocillos además se añade el análogo de AMPc con el aceptor de FRET, d2.

- Incubar durante 1h a temperatura ambiente.
- Realizar las medidas de fluorescencia de las muestras a 620 (donador) y 665 (aceptor) tras la excitación a 337nm (50µs intervalo) con un lector de placas FluoStar Omega)
- Calcular la medida ratiométrica de valor de FRET y el incremento específico ( $\Delta F$ ), teniendo en cuenta el valor obtenido del blanco mediante las ecuaciones:

$$FRET = \frac{F_{665nm(aceptor)}}{F_{620nm(donador)}} \cdot 10\,000$$

$$\Delta F(muestra) = \frac{FRET(muestra) - FRET(blanco)}{FRET(blanco)} \cdot 100$$

- Ajustar los valores matemáticamente a una relación lineal entre  $\Delta F$  y la concentración de AMPc y calcular los valores de concentración de AMPc (en pmoles/mg) de las muestras a partir de la recta patrón de las concentraciones conocidas:

$$\log \frac{\Delta F(muestra)}{\Delta F(máximo) - \Delta F(muestra)} = pte. \log[AMPc] + o.o.$$

## 2.7. Microscopía electrónica

### 2.7.1. Procedimiento

Para los experimentos de microscopía electrónica se usó el siguiente protocolo:

- Realizar los tratamientos necesarios (en placa). En caso se realizaron 3 tipos diferentes de tratamientos:

Control: 30min en HBM de lavado (Tabla III-16).

HU210: 20min en HBM de lavado y a continuación 10min en HU210 (5µM).

HU210+8pCpt: 5min en HBM, posteriormente 15min en 8pCpt (50µM) y luego en 10min 8pCpt (50µM)+HU210 (5µM).

- Fijar en tampón de fijación I (Tabla III-24), 2 horas a 4°C (en placa).
- Lavar en tampón Millonig a 4°C (2 veces; en placa). Dejar lavando durante la noche en Millonig a 4°C.
- Postfijación y osmicación: Añadir sobre el pocillo de la placa de cultivo Tampón de fijación II y mantener 1h a 4°C (en placa).

- Retirar el tampón de fijación II e inactivar los residuos con leche en polvo, para disminuir su toxicidad y lavar con agua ultrapura (3 veces en placa)
- Deshidrataciones en concentraciones crecientes de etanol en placa:

Etanol 30%; 5min

Etanol 50%; 5min

Etanol 70%; 5min

Etanol 80%; 5min

Etanol 90%; 5min

Etanol 95%; 5min

Etanol 100%; 5min (2 veces)

- Inclusión en concentraciones crecientes de resina SPURR en tapones de tubos Falcon de 15 ml

Resina / etanol 1/3; 1h

Resina / etanol 1:1; 1h

Resina / etanol 3/1; 2h

Resina pura; o/n

- Cambiar la resina pura del último paso por resina pura fresca. Mantener 48h a 70°C, para acelerar la polimerización de la resina. Las muestras fueron cortadas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (C.N.M.E.).

#### 2.7.2. Obtención de datos

Las medidas de distancia se realizaron con el programa ImageJ sobre las imágenes obtenidas a 80.000x en el C.N.M.E. La distancia de las vesículas sinápticas a la zona activa se determinaron midiendo la distancia entre la membrana externa de la vesícula y la membrana interna de la zona activa. Se multiplicó por 0,71, para transformar el número de píxeles en nanómetros. Los datos se representaron en Origin 8.0.

### **3. Estadística y ajustes**

La determinaciones estadísticas (t de Student, Análisis de la Varianza o ANOVA, test de Kolmogorov-Smirnov, etc) del presente trabajo se realizó con el programa Origin 8.0. En los casos de probabilidad acumulada se utilizó el programa Sigma Plot 11.0.

Las ilustraciones se realizaron con el programa Adobe Illustrator CS6.



## **IV RESULTADOS**





## IV RESULTADOS

Estudios previos de este laboratorio han demostrado que la activación prolongada del receptor CB1 lleva al silenciamiento de una subpoblación de terminales sinápticos como una manifestación extrema del fenómeno de inhibición presináptica puesto en marcha por estos receptores. El silenciamiento presináptico se caracteriza por la incapacidad para liberar neurotransmisor tras la llegada de un potencial de acción a pesar de una entrada de calcio normal y de una dotación aparentemente normal de proteínas de la maquinaria exocitótica (Cousin y Evans 2011; Crawford y Mennerick 2012), además de no tener alterada la funcionalidad de los receptores postsinápticos (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006). Es importante señalar que una sinapsis silente no debe ser confundida con una sinapsis con una baja probabilidad de liberación, cosa que puede ocurrir si el estímulo aplicado es demasiado débil (Cousin y Evans 2011).

Estos experimentos se realizaron en cultivos primarios de células granulares de cerebelo cargadas con la sonda anfipática FM1-43 a 7DIV. La sonda FM1 no tiene fluorescencia en disolución acuosa, pero sí en un entorno hidrofóbico como ocurre cuando está unida a membranas, por lo que es buen trazador de la dinámica de las membranas biológicas (Cousin 2008). La despolarización de las células (50mM KCl) permite la entrada de la sonda en las vesículas sinápticas que se tornan fluorescentes, mientras que una segunda despolarización provoca la fusión de las vesículas que han incorporado la sonda observándose la salida de la misma y una disminución de la fluorescencia. El grado de descarga representa, por tanto, la exocitosis de aquellas vesículas sinápticas que cargaron la sonda en el primer estímulo y que completaron el ciclo vesicular. Esta sonda fluorescente también ha sido utilizada para el estudio de botones presinápticos silentes (Ryan *et al.*, 1993; Cousin y Evans 2011).

En ensayos previos de nuestro laboratorio se observó que la activación del receptor CB1 mediante el agonista HU210 tras la fase de carga de la sonda llevaba a una inhibición de la descarga que iba más allá de una mera inhibición de la liberación por el receptor ya que no era contrarrestada por la aplicación de estímulos más fuertes (2min de estimulación con 50mM KCl) una estrategia que por sí misma debe anular los efectos inhibitorios de los receptores CB1 sobre la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ramírez-Franco *et al.*, 2014). La reducción de la descarga sólo se revirtió cuando junto con al agonista HU210 se aplicaba el antagonista del receptor CB1, SR141716 (Ramírez-Franco 2014), indicando la implicación de este receptor en el proceso.

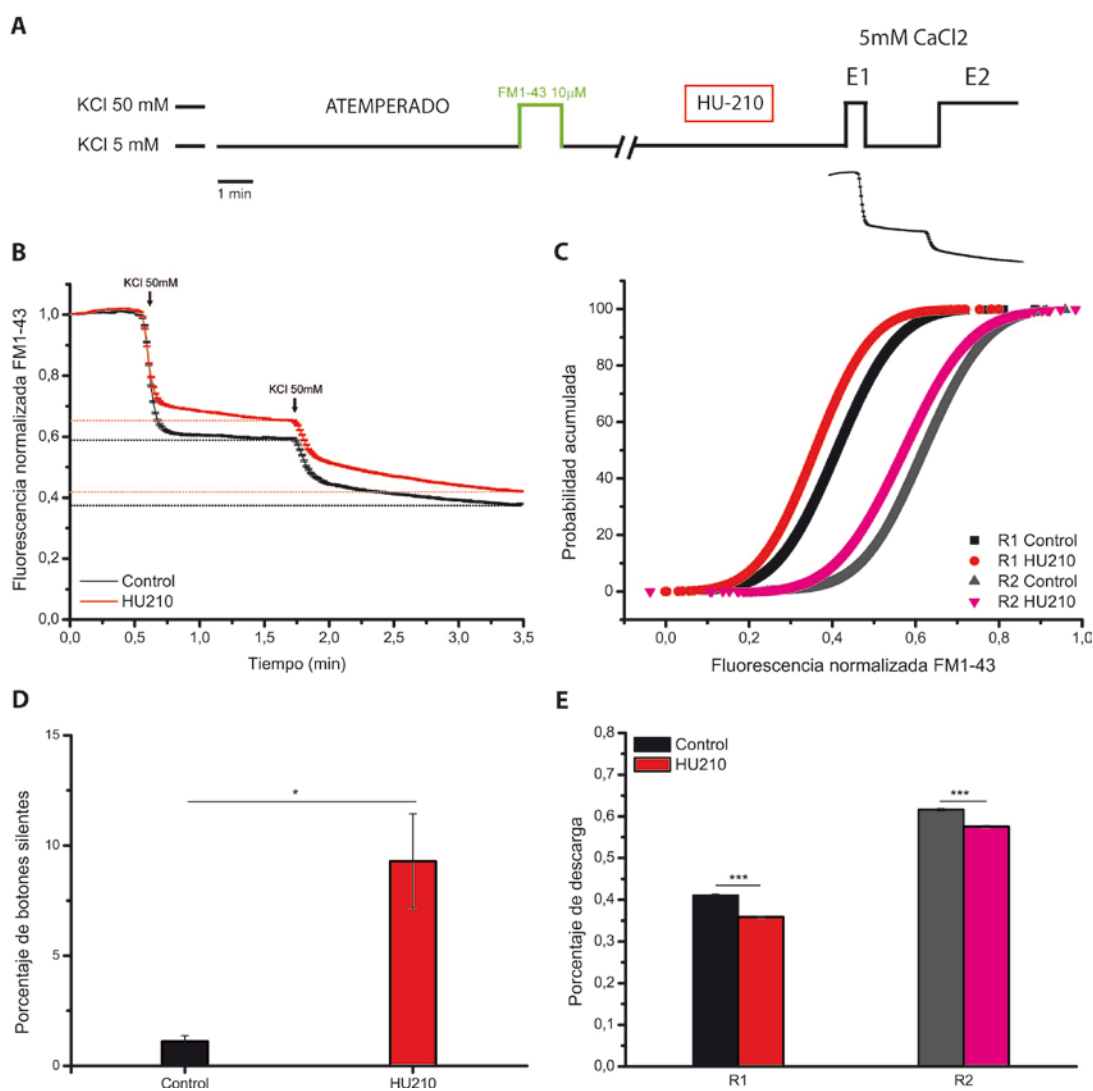
En el presente trabajo hemos continuado la caracterización del fenómeno de silenciamiento presináptico inducido por los receptores de cannabinoides con especial énfasis en el mecanismo de señalización molecular puesto en marcha por dichos receptores para alterar la maquinaria exocitótica y la capacidad de liberación de neurotransmisor.

### **1. El silenciamiento no se revierte por un incremento en la concentración de calcio extracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>**

La acción de los cannabinoides sobre la transmisión sináptica es debida a una disminución de la entrada de calcio por inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje y a la reducción de los niveles de AMPc por la inhibición de la adenilato ciclasa (Kreitzer y Regehr 2001; Brown *et al.*, 2004; Godino *et al.*, 2005; Chevaleyre *et al.*, 2007). En esta serie de experimentos estudiamos si altas concentraciones de calcio podían revertir el silenciamiento presináptico inducido por la activación del receptor CB1. Para ello realizamos experimentos con la sonda anfipática FM1-43. Se realizó una primera estimulación con KCl que permite la carga de la sonda en los botones funcionales de la preparación celular. A continuación las células se incubaron con el agonista cannabinoide HU210 durante 10min (Figura IV-1A) y seguidamente se realizó la fase de descarga con una estimulación corta (E1: 10seg) seguida de un intervalo de reposo de un minuto y una estimulación larga (E2: 2min). La idea es que una estimulación de baja magnitud debería favorecer la detección de acciones inhibitorias de los cannabinoides debidas a la reducción de la entrada de calcio, mientras que la estimulación prolongada debe poner de manifiesto cambios debidos exclusivamente a modificaciones de la maquinaria de liberación, dado que el control inhibitorio sobre los nanodominios de calcio estaría compensado en estas condiciones de estimulación. Además, el aumento de la concentración extracelular en las condiciones de estimulación fuertes, debería contrarrestar el efecto de la inhibición de la entrada de calcio causado por la acción del cannabinoide. Por tanto, cualquier reducción de la descarga de la sonda inducida por los cannabinoides en estas condiciones podría sugerir la existencia de silenciamiento presináptico. Así, en esta serie de experimentos se definieron como botones silentes aquellos que habiendo cargado sonda FM1-43 y a pesar de sufrir un apagamiento paulatino de la fluorescencia no respondían a ninguno de los dos estímulos (Ramírez-Franco 2014). Observamos que el tratamiento con HU210 (5μM) durante 10min indujo la misma reducción significativa en el grado de descarga a la concentración de Ca<sup>2+</sup> elevada (5mM) que a concentraciones de calcio fisiológicas (1,33mM) según se observó previamente (reducción de la descarga del 25% y del 8% en el primer y segundo pulso, respectivamente, (Ramírez-Franco 2014). Esta reducción en el grado de descarga, que persiste a 5mM de Ca<sup>2+</sup> extracelular, está relacionada con un aumento significativo en

## RESULTADOS

el porcentaje de botones silentes ( $9,3 \pm 2,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) en comparación con el control ( $1,1 \pm 0,3\%$ ) (Figura IV-1D). Así, en nuestro modelo de estudio existe un efecto causado por la activación del receptor CB1 que parece diferente a la inhibición clásica y que no puede ser contrarrestado mediante estimulaciones largas ni mediante el aumento de la concentración de calcio extracelular.

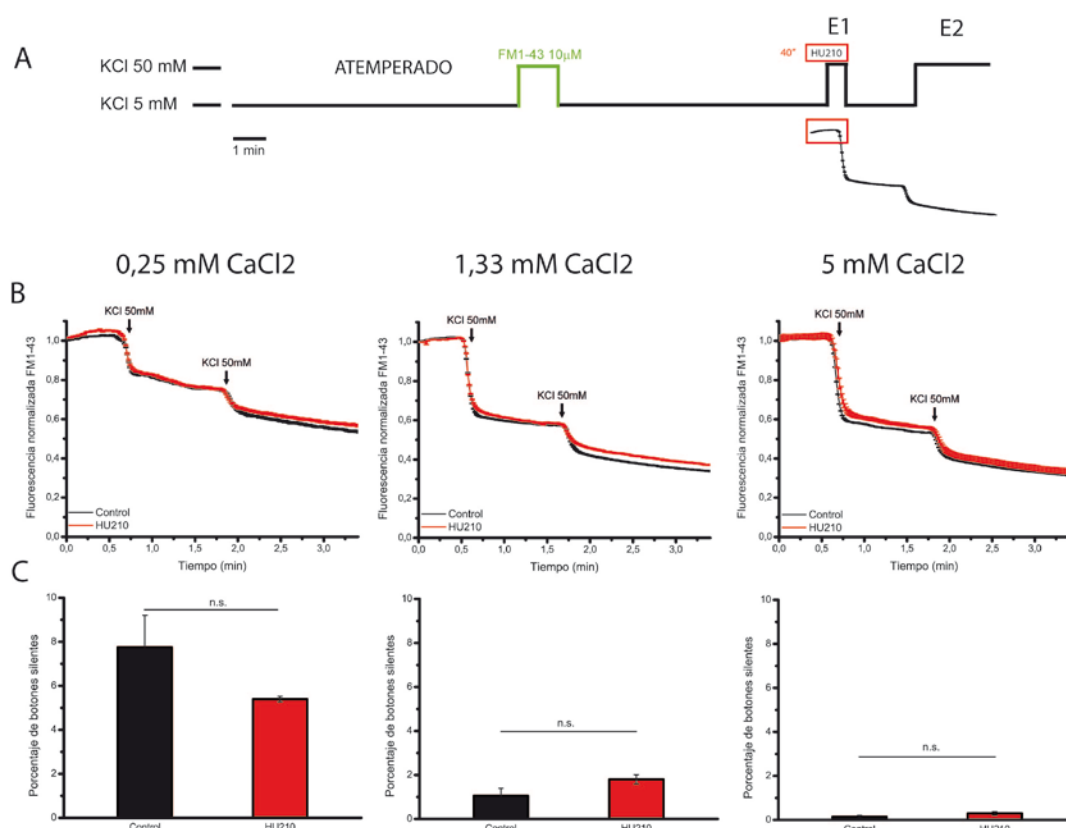


**Figura IV-1.** El tratamiento con cannabinoides induce un déficit de descarga de FM-1-43 que persiste a 5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. A) Protocolo de doble pulso usado en el experimento. B) Medias cinéticas obtenidas en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 (5  $\mu$ M) durante 10 min. N= nº de campos analizados, n= nº de botones sinápticos (Control: N=3, n=1948; HU210: N=4, n=3395). C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas en el primer (R1) y segundo pulso (R2) en ambas condiciones. D) Comparación de los porcentajes de botones silentes en condiciones control y tras el tratamiento con HU210. (Control:  $1,1 \pm 0,3\%$ ; HU210:  $9,3 \pm 2,2\%$ ) E) Cuantificación del porcentaje de descarga en ambos pulsos en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 (R1 Control:  $0,4 \pm 0,0\%$ ; HU210:  $0,4 \pm 0,0\%$ ; R2 Control:  $0,6 \pm 0,0\%$ ; HU210:  $0,6 \pm 0,0\%$ ). t-Student, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2. El silenciamiento requiere una activación prolongada del receptor CB1

Los datos obtenidos muestran que 10 minutos de tratamiento con el agonista cannabinoide llevan a una disminución de la descarga de la sonda FM-43 atribuible al silenciamiento de los botones sinápticos. Nos planteamos también si una activación más corta del receptor podía inducir el silenciamiento presináptico. Con ese objetivo diseñamos experimentos en los que las células se trataron con HU210 (5 $\mu$ M) durante 40seg, 30 en la línea base y 10 durante la estimulación con 50mM de KCl (Figura IV-2A). Además los experimentos se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de calcio, 0,25, 1,33 y 5mM para corroborar que el posible silenciamiento persiste a altas concentraciones de calcio extracelular,  $[Ca^{2+}]_e$ . En los experimentos realizados a concentraciones fisiológicas de  $[Ca^{2+}]_e$  1,33mM, el tratamiento con los cannabinoides (40seg) no indujo ninguna diferencia significativa en el grado de descarga de la sonda FM1-43, ni en el número de botones sinápticos silentes (Figura IV-2B, C, 1,33mM  $CaCl_2$ ). Además, se observó, que si bien los cannabinoides, a estos tiempos de tratamientos cortos (40seg), no afectaban al grado de descarga ni inducían silenciamiento alguno a cualquiera de las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_e$  estudiadas, el número de botones silentes de la preparación era inversamente proporcional a la concentración de  $[Ca^{2+}]_e$  (Figura IV-2C). De esta manera a  $[Ca^{2+}]_e$  de 0,25mM se observa un incremento significativo de los botones silentes en condiciones basales en la preparación de células granulares del cerebelo. Estos datos ponen de manifiesto que una débil entrada de  $Ca^{2+}$  puede hacer que botones activos se manifiesten como botones silentes, de ahí la necesidad de un estímulo que lleve a una fuerte entrada de  $Ca^{2+}$  para distinguir los botones sinápticos que son auténticos botones silentes.

## RESULTADOS



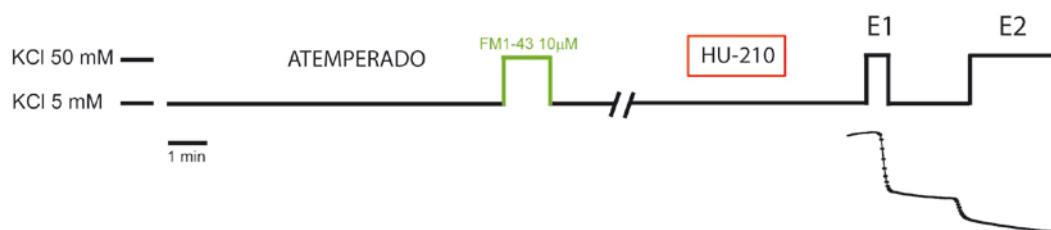
**Figura IV-2.** El silenciamiento requiere un tratamiento prolongado con HU210 y es independiente de la concentración de calcio extracelular. A) Protocolos usados en los experimentos en condiciones control o con 40seg de incubación con HU210 con diferentes concentraciones de calcio en la descarga. B) Medias cinéticas de la población total de botones. N=nº de campos analizados, n=nº de botones sinápticos. (0,25mM CaCl<sub>2</sub>: Control: N=2, n=867; HU210: N=2, n=694; 1,33 mM CaCl<sub>2</sub>: Control: N=4, n=3041; HU210: N=5, n=2648; 5 mM CaCl<sub>2</sub>: Control: N=5, 4074 botones; HU210: N=6, n=4599). C) Comparación de los porcentajes de botones silentes entre los diferentes tratamientos (0,25mM CaCl<sub>2</sub>: Control: 7,8 $\pm$ 1,4%; HU210: 5,4 $\pm$ 0,1%; 1,33mM CaCl<sub>2</sub>: Control: 1,1 $\pm$ 0,3%; HU210: 1,8 $\pm$ 0,2%; 5mM CaCl<sub>2</sub>: Control: 0,2 $\pm$ 0,1%; HU210: 0,3 $\pm$ 0,8%). t-Student, <sup>n.s.</sup> p>0,05.

### 3. Posibles proteínas de la maquinaria exocitótica implicadas en el silenciamiento

Realizamos experimentos para correlacionar el silenciamiento con el contenido en proteínas de la zona activa presináptica. Los experimentos funcionales con la sonda FM1-43 para identificar los botones silenciados por el tratamiento con HU210 fueron seguidos de experimentos de inmunocitoquímica *post-hoc*, para determinar los niveles de inmunorreactividad de forma semi-cuantitativa. Se analizaron las proteínas de la maquinaria exocitótica RIM1 $\alpha$  y Munc13-1 que tienen un papel central en la liberación de neurotransmisor. Las proteínas RIM organizan la zona activa (Sudhof 2012), reclutan canales de Ca<sup>2+</sup> en los sitios de liberación (Kaesler *et al.*, 2011) e inducen la formación de un heterómero activo con Munc13 (Deng *et al.*, 2011), mientras que las proteínas Munc13 son esenciales para la exocitosis ya que promueven la conformación abierta de la proteína syntaxina y el inicio de la formación del complejo SNARE (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2013). Analizamos también por inmunocitoquímica

el contenido en receptor CB1 de los botones sinápticos con el fin de establecer si el silenciamiento inducido por los cannabinoides se relaciona con un alto contenido en receptores CB1.

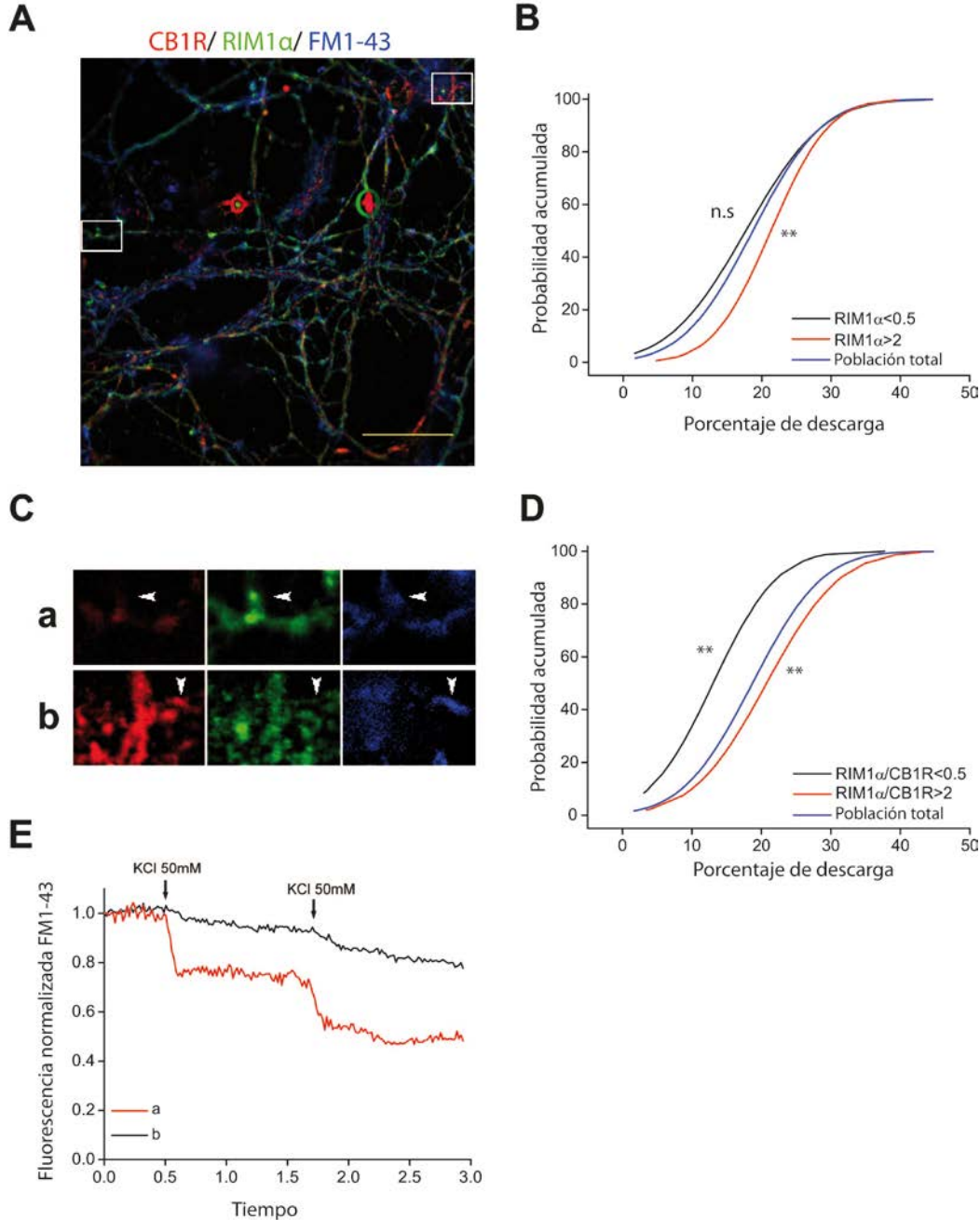
Las respuestas de descarga de FM1-43 de botones sinápticos individuales se segregaron a ciegas en función de sus niveles de inmunorreactividad, relativizada a la media de cada campo analizado. De forma arbitraria se segregaron tres grupos: botones cuyo valor de inmunorreactividad era inferior a 0,5, siendo 1 el valor medio; botones cuyo valor de inmunorreactividad era superior a dos veces la media; y por otro lado la población total. Los botones pertenecientes a cada grupo se seleccionaron sin tener en cuenta sus cinéticas individuales y se representó la respuesta promedio de cada uno de estos grupos. Este tipo de segregación evita cualquier tipo de sesgo, dado que la selección de las regiones de interés y la posterior segregación de las respuestas se llevaron a cabo de forma automatizada. A continuación se muestra el protocolo utilizado en el estudio de las cuatro proteínas:



**Figura IV-3.** Protocolo empleado en los experimentos de FM1-43 post hoc. Posterior a la carga con la sonda las células eran tratadas con HU210 5µM durante 10min. A continuación se realizaban dos pulsos (E1 y E2) con 50mM KCl espaciados por un intervalo de 1min.

Encontramos una relación entre el grado de descarga de FM1-43 inducido por una estimulación de 10seg de perfusión de KCl 50mM y los niveles de inmunorreactividad de la proteína RIM1α. Sin embargo, sólo aquellos botones sinápticos con valores de inmunorreactividad, IR, dos o más veces por encima del valor de la media exhibieron una respuesta significativamente diferente a la población total, no encontrándose diferencias significativas en la población con niveles de IR inferiores a 0,5 veces el valor medio de la población (Figura IV-4B). Además determinamos el cociente RIM1α/CB1R para cada uno de los botones analizados, dividiendo los valores normalizados de inmunorreactividad de la proteína RIM1α entre los valores normalizados de inmunorreactividad del receptor CB1. Se observó una segregación entre ambos grupos (Figura IV-4C). La figura IV-4Ca muestra un ejemplo de un botón sináptico activo, que ha cargado sonda FM1-43, que es visualizado perfectamente con el anticuerpo contra RIM1α, pero que no lo es con el anticuerpo anti CB1R, indicativo de un alto y bajo contenido, respectivamente, en estas dos proteínas. Este botón sináptico activo muestra un perfil de descarga fuerte de la sonda (Figura IV-4E).

Además se muestra un ejemplo de botón sináptico silenciado con los cannabinoides, que previamente ha cargado la sonda FM1-43, que tiene un contenido alto en receptor CB1 y un bajo contenido en RIM1 $\alpha$  (Figura IV-4Cb) y que muestra un perfil de descarga débil tras la despolarización (Figura IV-4E).

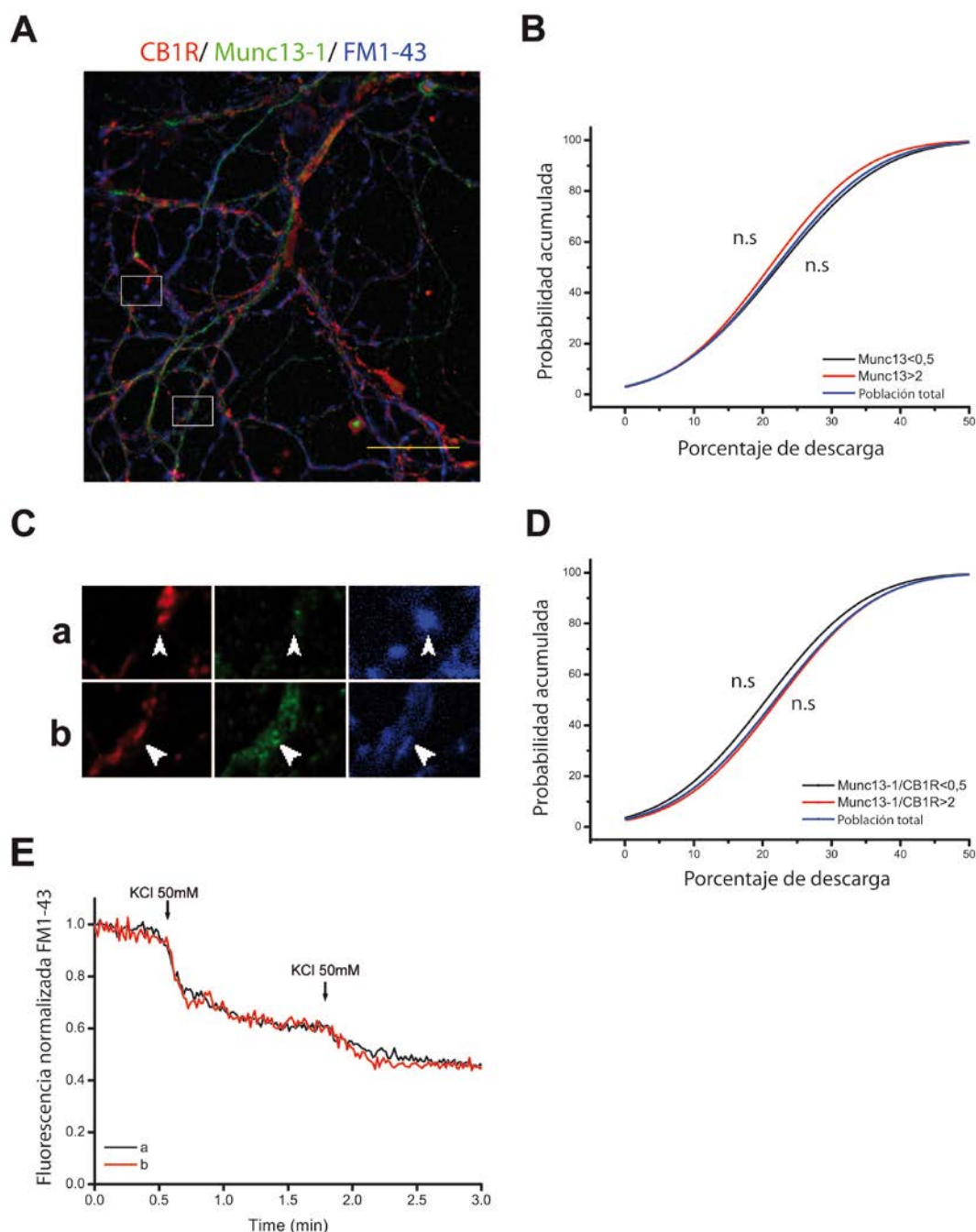


**Figura IV-4.** El grado de descarga depende de la ratio RIM1 $\alpha$ /CB1R. A) Imagen de inmunocitoquímica post hoc donde se observa el marcaje de RIM1 $\alpha$  (verde) y CB1R (rojo). Escala= 50 $\mu$ m. El marcaje de FM1-43 se muestra en pseudocolor (azul). B) Distribución de la probabilidad acumulada de la descarga de los botones con bajo (N=4, n=1300) y alto contenido (N=4, n=502) de RIM1 $\alpha$ , y de la población total de botones (N=4, n=3666). N=nº de campos analizados, n=nº de botones sinápticos. C) Detalle de las zonas marcadas en A). D) Gráfica de probabilidad acumulada de botones con distintos cocientes de RIM1 $\alpha$ /CB1R. E) Registros individuales de respuestas de los botones señalados en C). Se pueden apreciar las grandes diferencias en la descarga de FM1-43 en función del cociente RIM1 $\alpha$ /CB1R (a, RIM1 $\alpha$ /CB1R R>2; b, RIM1 $\alpha$  /CB1R <0,5). <sup>n.s.</sup>p>0,05; \*\*p<0,01; Test de Kolmogorov-Smirnof.



Estudiamos también la correlación existente entre el silenciamiento presináptico inducido por el cannabinoide HU210 y el contenido de la proteína de la zona activa Munc13-1. Sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias significativas en el grado de descarga de la sonda FM1-43 al segregar los botones según los niveles de inmunorreactividad de la proteína Munc13-1 (Figura IV-5B) ni según el cociente Munc-13-1/CB1 (Figura IV-5D). Probablemente porque sólo la proteína Munc13-1 de la membrana plasmática y no la citosólica se correlaciona con la capacidad exocitótica de los botones sinápticos. Se muestran también ejemplos de dos botones uno con un alto cociente Munc13-1/CB1R (Figura IV-5Cb) y otro con un bajo cociente Munc13-1/CB1R (Figura IV-5Cb) cuyos perfiles de descarga de sonda FM1-43 se muestran en (Figura IV-5E).

Estos datos parecen indicar que el contenido en la proteína RIM1 $\alpha$  es un buen determinante de la capacidad de exocitosis de los botones sinápticos (Ramirez-Franco *et al.*, 2014) y que un alto contenido en el receptor CB1 así como un bajo contenido en la proteína RIM1 $\alpha$  podrían ser la etiqueta molecular de los botones sinápticos susceptibles de ser silenciados por los cannabinoides.

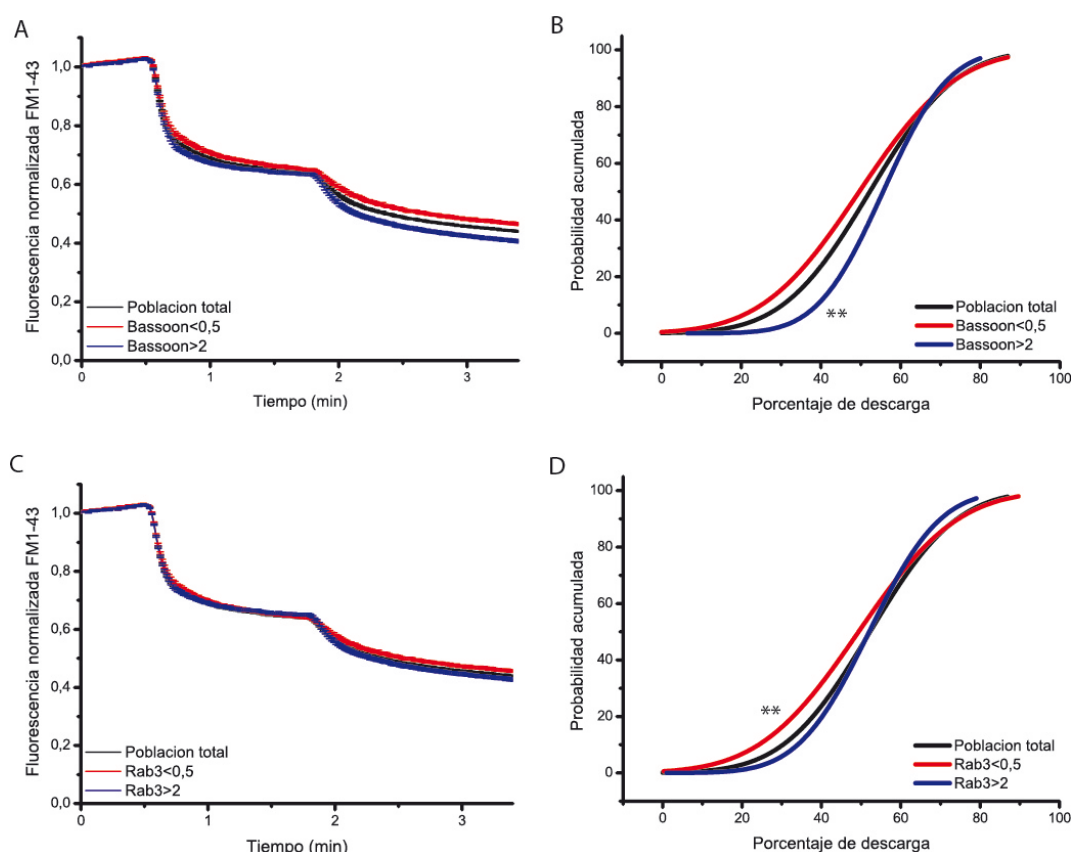


**Figura IV-5.** El grado de descarga es independiente del contenido de la proteína Munc13-1. A) Imagen de inmunocitoquímica post hoc dónde se observa el marcaje de Munc13-1 (verde) y CB1R (rojo). Escala= 50 $\mu$ m. También se muestra el marcaje de FM1-43 en pseudocolor (azul). B) Distribución de la probabilidad acumulada de la descarga de los botones con bajo (N=4, n=2261) y alto contenido de Munc13-1 (N=4, n=761), y de la población total de botones (N=4, n=4461). N=nº de campos analizados, n=nº de botones sinápticos. C) Detalle de las zonas marcadas en A). D) Gráfica de probabilidad acumulada de botones con distintos cocientes de Munc13-1/CB1R. E) Registros individuales de respuestas de los botones señalados en C). Se puede ver que las respuestas son muy parecidas a pesar de tener cocientes muy diferentes (a, Munc13-1/CB1R>2; b, Munc13-1/CB1R<0,5). <sup>n.s.</sup> p>0,05; Test de Kolmogorov-Smirnof.

Motivados por la relación que encontramos entre el contenido de algunas proteínas de la zona activa esenciales para la función presináptica y el porcentaje de descarga quisimos estudiar otras proteínas que también pudieran ser utilizadas como indicadores de eficacia sináptica. Con ese objetivo realizamos experimentos similares

de doble pulso, pero en este caso sin tratar a las células con el agonista cannabinoide HU210. Elegimos las proteínas de la zona activa Bassoon y Rab3. Bassoon es una proteína presináptica de gran tamaño que forma la citomatriz de la zona activa que parece estar relacionada con el agrupamiento de las vesículas sinápticas (Mukherjee *et al.*, 2010). Rab3 es una GTPasa monomérica asociada a la membrana de las vesículas sinápticas. Se cree que el complejo heterotrimérico del dominio N-terminal de RIM junto con Munc13 y Rab3 o Rab27 es el que acerca las vesículas a la membrana (Dulubova *et al.*, 2005), siendo así responsable del proceso de amarre o anclaje de las mismas (Gracheva *et al.*, 2008; Kaeser *et al.*, 2011). Rab3 también ha sido relacionada con cambios en la plasticidad sináptica a largo plazo (Castillo *et al.*, 1997; Schoch *et al.*, 2002; Tsetsenis *et al.*, 2011).

En relación con la proteína Bassoon encontramos que aquellos botones sinápticos que exhiben un mayor grado de descarga tienen un mayor contenido de la proteína Bassoon ( $p < 0,05$ , Figura IV-6A, B). Por otro lado, los botones con un contenido bajo en la proteína Rab3 mostraron un grado de descarga de la sonda FM1-43 significativamente menor respecto a toda la población de botones ( $p < 0,05$ , Figura IV-6C, D).



**Figura IV-6.** Las proteínas Bassoon y Rab3 influyen sobre el grado de descarga de la sonda F1-43. Cinética de descarga de la sonda FM1-43 de los botones según su contenido en A) Bassoon y C) Rab3. En negro se representa la población total de botones sinápticos (Bassoon N=5, n=3803; Rab3 N=5, n=3803, en rojo los que tienen un valor de inmunorreactividad inferior a 0,5 del valor medio (Bassoon N=5, n=1857; Rab3 N=5, n=1810); y en azul los que presentan valores de inmunorreactividad superior a 2 veces el valor medio de inmunorreactividad (Bassoon N=5,

## RESULTADOS

n=623; Rab3 N=5, n=651). N=nº de campos analizados, n=nº de botones sinápticos. Distribución de la probabilidad acumulada de la descarga de los botones con bajo y alto contenido de B) Bassoon y D) Rab3, y de la población total de botones sinápticos. <sup>n.s.</sup>p>0,05; \*\*p<0,01; Test de Kolmogorov-Smirnov.

Como se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos el uso de la sonda FM1-43 tiene algunas desventajas como la necesidad de una estimulación previa de las células para su carga. Además esta estimulación podría poner en marcha la síntesis de cannabinoides endógenos (Devane *et al.*, 1992; Di Marzo *et al.*, 1994) y ocluir en cierto grado los efectos observados por los cannabinoides exógenos. La sonda FM1-43 tampoco es un buen trazador de todas las formas de liberación de neurotransmisor. Así, mientras la pérdida total de fluorescencia es consistente con una fusión completa de las vesículas sinápticas con la membrana, una pérdida parcial de fluorescencia puede suceder cuando hay una exocitosis de tipo *kiss and run* (Aravanis *et al.*, 2003; Harata *et al.*, 2006). De esta forma las sinapsis que hayan experimentado *kiss and run* probablemente no hayan podido realizar una incorporación máxima de sonda durante la fase de carga. Por esta razón, para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides se utilizaron células granulares de rata de 7DIV transfectadas con vGlut1-pHluorina, que es una sonda codificada genéticamente y que por tanto no requiere la estimulación previa de la preparación. Como ya se ha mencionado, con la sonda vGlut1-pHluorina la exocitosis provocada por la despolarización (50mM KCl), se observa como un incremento de la fluorescencia debido a la exposición de la pHluorina al pH neutro del medio extracelular. Después, la fluorescencia disminuye debido a la endocitosis compensatoria y a la re-acidificación del interior de las vesículas sinápticas. Tras la perfusión de NH<sub>4</sub>Cl se obtiene una señal de fluorescencia máxima que corresponde a la neutralización del interior de todas las vesículas sinápticas de la preparación (Figura IV-7B), por lo que todas las respuestas se pueden normalizar a esta señal máxima y, por tanto, calcular la fracción de vesículas sinápticas que hacen exocitosis tras un estímulo. Otra ventaja del empleo de la sonda vGlut1-pHluorina está en que las células pueden ser estimuladas de manera repetida observándose, en condiciones control, aumentos transitorios de la fluorescencia de la misma magnitud tras cada estimulación (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). En la preparación de células granulares a 7DIV transfectadas con vGlut1-pHluorina la despolarización con KCl induce una respuesta de exocitosis-endocitosis de alrededor de un 30-40% de la respuesta máxima inducida por NH<sub>4</sub>Cl. El agonista cannabinoide HU210 (5µM, 10min) redujo la respuesta de exocitosis promedio de los botones sinápticos. El análisis de las respuestas individuales permite distinguir dos subpoblaciones: por un lado los botones sinápticos que permanecen activos tras el tratamiento con HU210 y que exhiben una respuesta de exocitosis superior al 4% de la respuesta del NH<sub>4</sub>Cl (que constituye el nivel de ruido de los registros de fluorescencia individuales) y una subpoblación de botones sinápticos cuya respuesta es inferior al 4% de la respuesta de NH<sub>4</sub>Cl y que denominamos botones sinápticos silentes (Ramirez-Franco *et al.*, 2014).

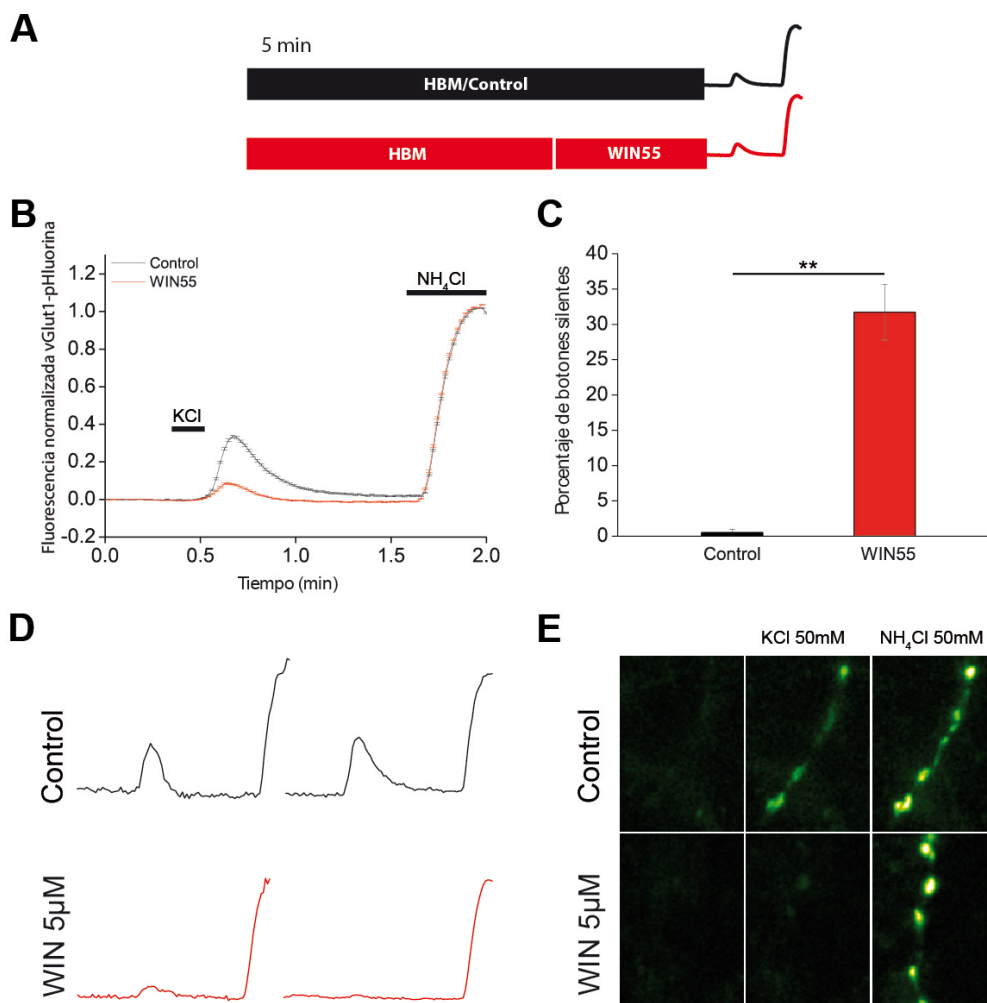
El análisis individual de los botones sinápticos en experimentos en los que el tratamiento con HU210 se realizó entre dos pulsos de despolarización con KCl ha indicado que la subpoblación de botones sinápticos que permanecen activos tras el tratamiento con cannabinoides en realidad comprende algunos botones sinápticos que no muestran respuesta alguna a los cannabinoides y otros muchos con un grado de inhibición variable (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Por otro lado, la subpoblación de botones silentes se caracteriza por ser incapaz de liberar neurotransmisor tras la llegada de un potencial de acción pese a experimentar una entrada de calcio normal y contar con las proteínas de la maquinaria exocitótica (Cousin y Evans 2011; Crawford y Mennerick 2012).

Por tanto, en esta segunda parte de la Tesis Doctoral hemos profundizado en los mecanismos moleculares del silenciamiento presináptico mediante el uso de vGlut1-pHluorina como herramienta para monitorizar el ciclo de las vesículas sinápticas.

#### **4. El silenciamiento es inducido también por otros agonistas del receptor CB1**

En primer lugar determinamos si el silenciamiento podía ser inducido también por la activación prolongada del receptor CB1 con otros agonistas distintos a HU210 como WIN55512. Realizamos experimentos de un pulso de despolarización con KCl (50mM, 10seg) en células granulares de cerebelo transfectadas con vGlut1-pHluorina en condiciones control y tras un tratamiento con el agonista WIN55512 5 $\mu$ M durante 10min (Figura IV-7A). En las células control la estimulación con KCl indujo una respuesta de exocitosis–endocitosis promedio que implica a un (33,5 $\pm$ 0,0%) de las vesículas del botón sináptico en base a su comparación con la respuesta inducida por el NH<sub>4</sub>Cl (Figura IV-7B). La incubación con el agonista cannabinoide WIN55 (5 $\mu$ M, 10min) produjo una fuerte reducción de la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de los botones sinápticos inducida por KCl (0,1 $\pm$ 0,0%) (Figura IV-7B). El análisis de las respuestas individuales permite distinguir dos poblaciones de botones sinápticos: una población de botones sinápticos activos, aunque con una respuesta fuertemente inhibida en la mayoría de los casos, y otra subpoblación de botones sinápticos que no responden a la despolarización (botones silentes) (Figura IV-7D). Así, mientras el porcentaje de botones silentes observado en el control fue muy bajo (0,5 $\pm$ 0,5%), este aumentó de forma significativa ( $p < 0,01$ ) en presencia de WIN55 (31,7 $\pm$ 3,9%) (Figura IV-7C). La figura IV-7E muestra ejemplos de botones sinápticos individuales que responden a KCl en las células control pero no lo hacen tras el tratamiento con el agonista cannabinoide WIN55512. En conjunto, estos datos muestran que el silenciamiento presináptico también puede ser inducido con otros

agonistas cannabinoides corroborando la participación del receptor CB1 en el fenómeno (Ramirez-Franco *et al.*, 2014).



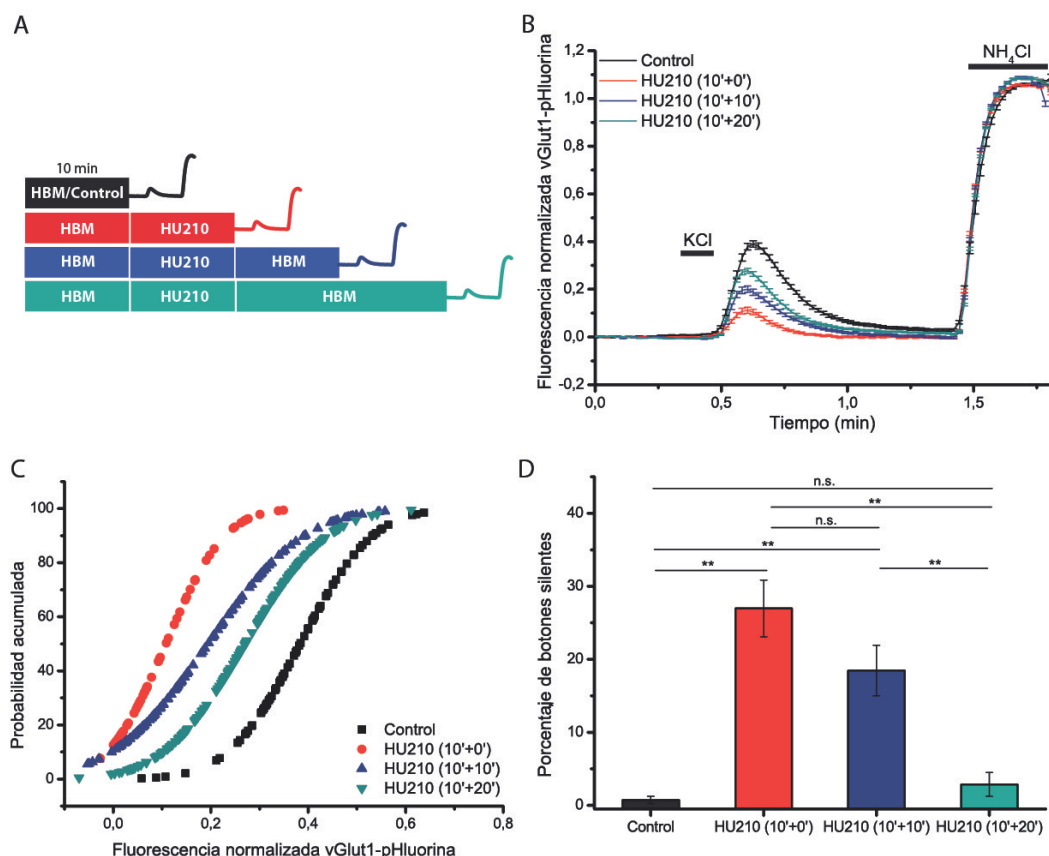
**Figura IV-7.** El agonista cannabinoide WIN5512 induce el silenciamiento de los botones sinápticos. A) Protocolos usados en los experimentos. B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control y tras el tratamiento con WIN5512 5µM, 10 min. (Control N=5, n=229; WIN55 N=7, n=364) (N= nº de campos, n= nº de botones sinápticos). C) Comparación de los porcentajes de botones silentes en las células control y en las tratadas con WIN5512. D) Ejemplos de registros individuales de botones activos (Control) y de botones inhibidos o silentes tras el tratamiento con el agonista (WIN55). E) Imagen de fluorescencia de respuestas individuales de botones sinápticos activos y de botones sinápticos silentes tras el tratamiento con WIN5512. t-student \*\*p< 0,01.

## 5. El silenciamiento presináptico es un fenómeno transitorio

Cómo se ha comentado en la introducción el receptor CB1 está implicado en la inhibición de la liberación de neurotransmisor a corto y a largo plazo. Los efectos a corto plazo (*STD*, *Short-Term Depression*) se deben a la inhibición de la entrada de calcio por los canales de calcio dependientes de voltaje, así como a activación de la salida de potasio por apertura de los canales rectificadores de potasio (Mackie *et al.*, 1995; Guo y Ikeda 2004). Por otro lado, la depresión a largo a plazo o LTD (*Long-Term*

*Depression*) se ha relacionado con la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y la disminución de los niveles de AMPc (Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009). La reducción en los niveles de este mensajero se ha asociado a cambios persistentes sobre la maquinaria exocitótica (Schoch *et al.*, 2002; Azad *et al.*, 2004; Heifets y Castillo 2009; Tsetsenis *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2012). Hay que señalar que la inducción de la LTD requiere tiempos de activación del receptor CB1 mucho mayores que los requeridos en la inducción de los fenómenos de STD (Chevalleyre y Castillo 2003; Ronesi *et al.*, 2004).

Con el fin de conocer la posible relevancia del silenciamiento presináptico en los fenómenos de plasticidad determinamos si el silenciamiento era un proceso permanente o podía ser revertido tras la retirada del agonista. Con este objetivo diseñamos un protocolo en el cual incubamos las células con HU210 (5 $\mu$ M, 10min) y determinamos el número de botones silentes inmediatamente después (HU210 10'+0'), y tras un periodo de lavado con HBM de 10 (HU210 10'+10') y de 20min (HU210 10'+20') (Figura IV-8A). Los resultados muestran que a medida que aumenta el tiempo de lavado se va recuperando la respuesta exocitótica (Figura IV-8B, C) como consecuencia de que el número de botones silentes se va reduciendo (27,0 $\pm$ 3,9% HU210 10'+0'; 18,5 $\pm$ 3,5% HU210 10'+10'; 2,9 $\pm$ 1,7% HU210 10'+20' frente a un control de 0,7 $\pm$ 0,5%) (Figura IV-8D). Estos datos sugieren que el silenciamiento inducido por los cannabinoides es un fenómeno reversible y que los botones silenciados después de un tiempo se convierten en botones sinápticos activos.

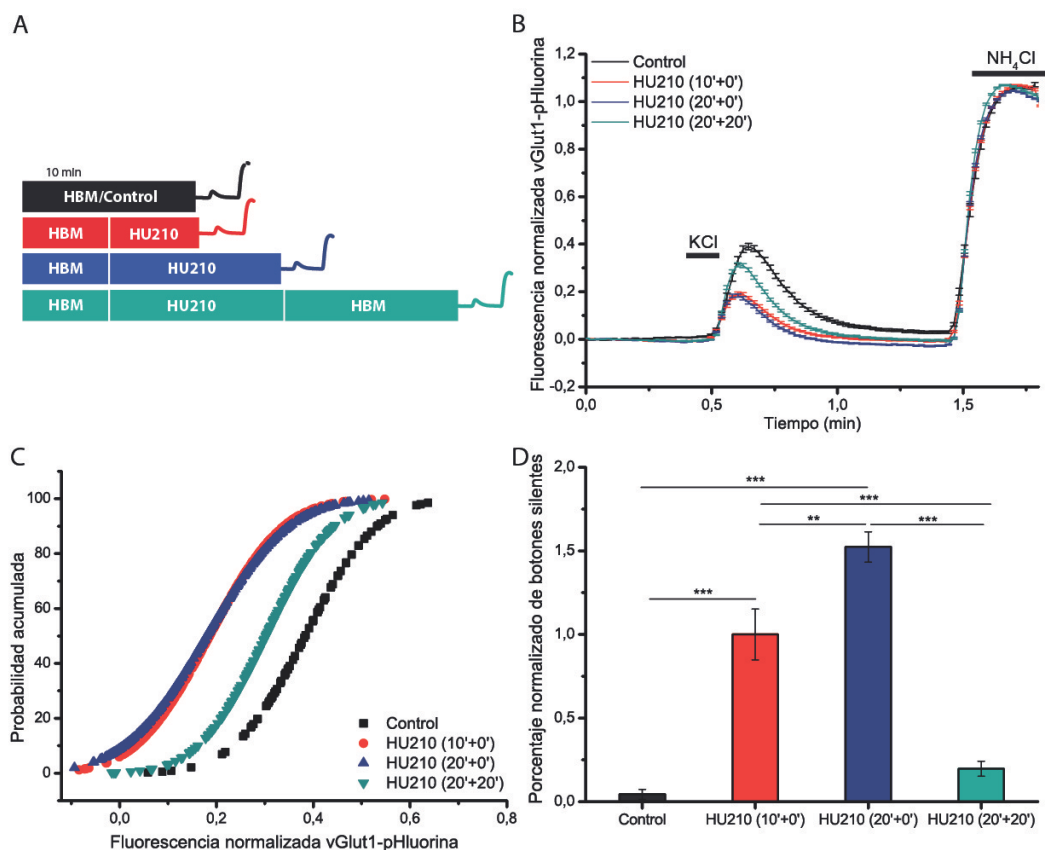


**Figura IV-8.** El silenciamiento inducido por el cannabinoide HU210 es transitorio. (A) Protocolos de incubación y tiempos de lavado usados en los experimentos. (B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 (5μM, 10min), inmediatamente después (HU210 10'+0'); y 10min (HU210 10'+10') y 20min (HU210 10'+20') después del tratamiento. (Control: N=5, n=147; HU210: 10' 0': N=3, n=63; HU210: 10'+10': N=5, n=133; HU210: 10'+20': N=5, n=175; N, n° de cubreobjetos; n, n° de botones sinápticos). (C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales. (D) Comparación de los porcentajes de botones silentes entre los diferentes tratamientos. ANOVA con test de Bonferroni, <sup>n.s</sup>p>0,05, \*\*p< 0,01.

En experimentos similares aumentamos el tiempo de tratamiento con HU210 con el fin de ver si aumentaba el porcentaje de botones silentes o si por lo contrario habíamos llegado a un techo en la inducción del silenciamiento presináptico (Figura IV-9A). La incubación de las células granulares con HU210 5μM durante 20min (HU210 20'+0') redujo la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos en un grado comparable a la incubación de 10min con el agonista cannabinoide (HU210 10'+0') (Figura IV-9B,C). No obstante, el porcentaje de botones silentes aumentó significativamente tras doblar el tiempo de incubación con HU210 (14,0±2,1% con HU210 10'+0' y 21,3±1,3% con HU210 20'+0') (Figura IV-9D). Es importante señalar que tras 20min de lavado después de la incubación con HU210 (HU210 20'+20') la mayor parte de los botones silenciados volvían al estado activo, mientras que el porcentaje de botones que permanecían silentes era muy bajo (2,7±0,6%).



## RESULTADOS

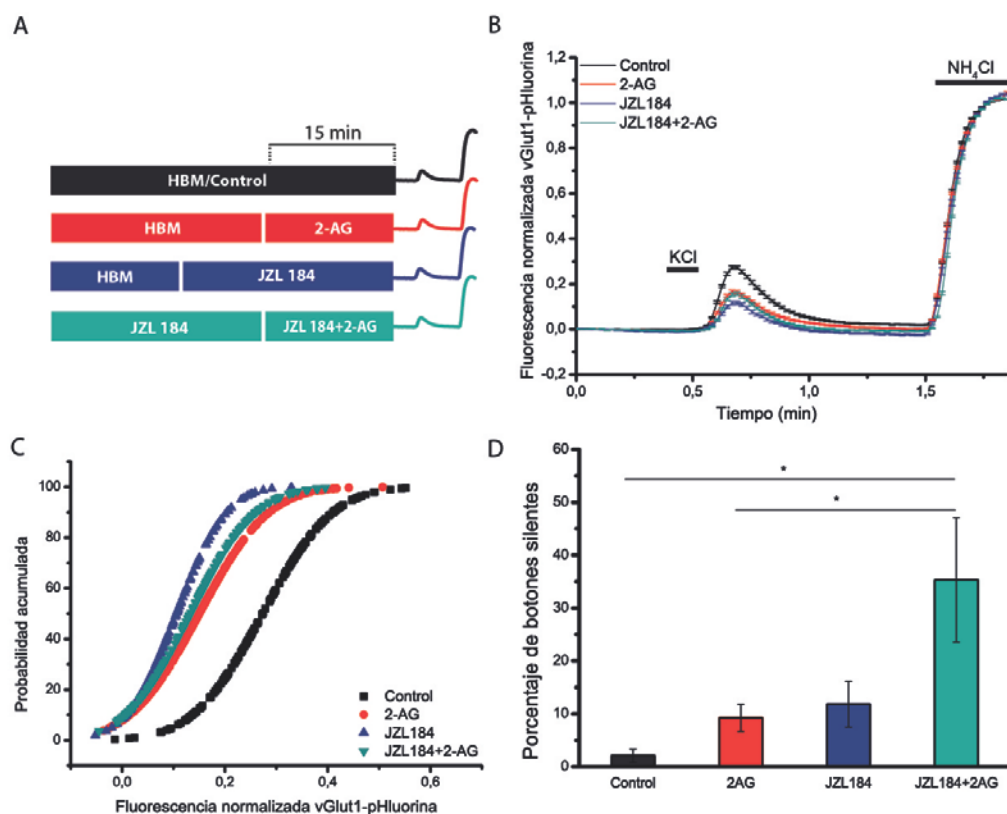


**Figura IV-9.** Sólo una subpoblación de botones sinápticos es susceptible al silenciamiento inducido por HU210. A) Protocolos usados en los tratamientos con HU210. B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control e inmediatamente después del tratamiento con HU210 (5μM) durante 10 minutos (HU210 10'+0'); durante 20 minutos (HU210 20'+0') y 20 minutos después del tratamiento con HU210 durante 20 minutos (HU210 20'+20'). (Control: N=4, n=77; HU210: 10' N=8, n=284; HU210: 20' N=10, 360; HU210: 20'+20' N=6, 182; N, n° de cubreobjetos; n, n° de botones sinápticos). C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales. D) Porcentajes de botones silentes. ANOVA con test de Bonferroni, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Por tanto, el silenciamiento es un fenómeno de naturaleza reversible independientemente del grado de silenciamiento que se induce. Esta transitoriedad podría estar relacionada con datos de LTD obtenidos en cerebelo que muestran que sólo la fase de inducción de la LTD depende de la acción de los cannabinoides CB1 (Safo y Regehr 2005). Por otro lado, habría que recordar que una de las peculiaridades de la LTD en las sinapsis entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo es su expresión postsináptica (Wang *et al.*, 2000; Ito 2001; Safo y Regehr 2005) a diferencia del silenciamiento presináptico observado en nuestro modelo de estudio.

## 6. El silenciamiento también se induce con el endocannabinoide 2-araquidonilglicerol

En otra serie de experimentos quisimos conocer si el cannabinoide endógeno 2-araquidonilglicerol también induce el silenciamiento de los botones sinápticos. Con este objetivo tratamos las células granulares transfectadas con vGlut1-pHluorina con 2-araquidonil glicerol (2-AG, 60 $\mu$ M, 15min, Figura IV-10A). Este tratamiento disminuyó la respuesta de exocitosis-endocitosis inducida por KCl (Figura IV-10B, C) debido al incremento en el porcentaje de botones silentes (9,2 $\pm$ 2,6%) en comparación con células control (2,1 $\pm$ 1,3%), aunque el incremento no fue significativo (Figura IV-10D). Dado que a diferencia de los cannabinoides sintéticos, el endocannabinoide 2-AG es susceptible de ser degradado, determinamos si la ausencia de un efecto significativo en el silenciamiento podía ser debida a la degradación del 2-AG. Así, el mismo tratamiento combinado JZL184 (1 $\mu$ M, 30min) un inhibidor de la monoacil glicerol lipasa (MGL), enzima que degrada el 2-AG in vivo (Dinh *et al.*, 2002; Dinh *et al.*, 2004; Vandevoorde y Lambert 2007), aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) el número de botones silentes inducidos por 2-AG (35,3 $\pm$ 11,7%, Figura IV-10D). El inhibidor JZL184 por sí mismo también mostró una tendencia a aumentar el número de botones silentes (11,8 $\pm$ 4,3%) aunque no de manera significativa (Figura IV-10D), indicando la producción tónica de endocannabinoides en nuestras condiciones de cultivo. Por tanto, el hecho de el endocannabinoide 2-AG también induzca el silenciamiento presináptico sugiere la posible relevancia fisiológica de este fenómeno.



**Figura IV-10.** El endocannabinoide 2-araquidionilglicerol también induce el silenciamiento presináptico. A) Protocolo experimental. B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control y tras el tratamiento con 2-araquidionil glicerol (60μM, 15min), JZL 184 (1μM, 30min); y JZL184+2-AG. (Control: N=5, n= 201; 2-AG: N=10, n=271; JZL184: N=6, N=115; JZL184+2-AG: N=8, n=214 botones. N, nº de cubreobjetos; n, nº de botones sinápticos). C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales. D) Porcentajes de botones silentes. ANOVA con test de Bonferroni, \* p<0,05.

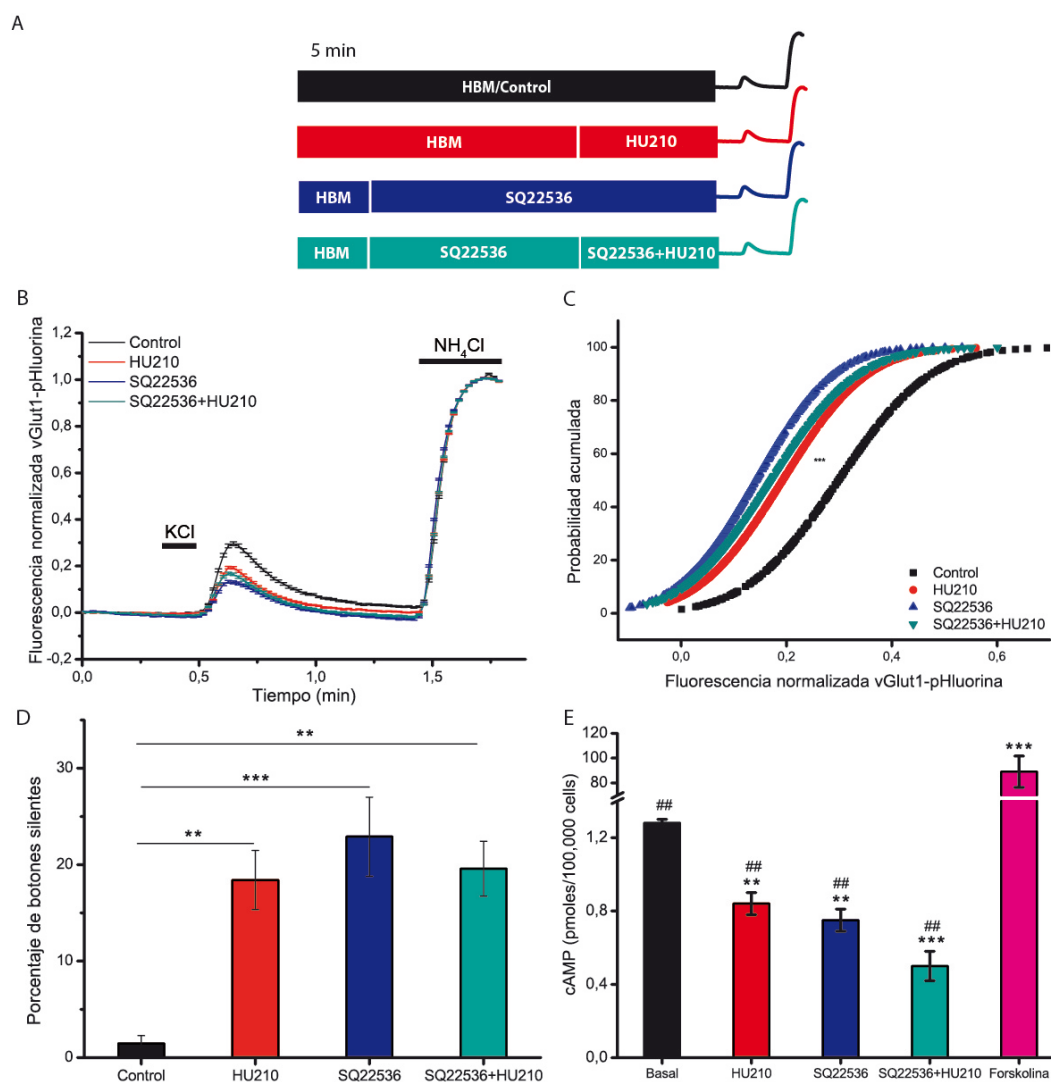
## 7. El silenciamiento presináptico está relacionado con una reducción en los niveles de AMPc

Dado que los efectos a largo plazo de la señalización del receptor CB1 implican la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y que la depresión duradera de la transmisión sináptica (LTD) dependiente de los receptores CB1 también se ha relacionado con cambios en los niveles de AMPc (Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009) nos planteamos si una reducción en los niveles de este mensajero era la responsable del silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides. Por esa razón se llevaron a cabo experimentos con el inhibidor de la AC SQ22536 que de acuerdo con esta idea debería inducir por sí mismo el silenciamiento presináptico y además ocluir el silenciamiento inducido por el agonista cannabinoide. La incubación de las células durante 25min con SQ22536 (100μM) redujo la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos (Figura IV-11B, C) e incrementó significativamente (p<0,05) el porcentaje de botones silentes (23,0±4,1%)

respecto al control ( $1,5 \pm 0,8\%$ ). El grado de silenciamiento inducido por SQ22536 fue similar al inducido por el tratamiento con HU210 ( $18,4 \pm 3,1\%$ ) (Figura IV-11D). Además el tratamiento con SQ22536, previo a la incubación con HU210 (Figura IV-11A) ocluyó el silenciamiento inducido por el agonista cannabinoide ( $19,6 \pm 2,9\%$ ). Estos resultados indican la posible implicación de una disminución de los niveles de AMPc en el fenómeno de silenciamiento presináptico.

En otra serie de experimentos se determinaron los niveles de AMPc en el cultivo primario de neuronas de cerebelo (Figura IV-11E). Los niveles basales de este mensajero ( $1,28 \pm 0,02$  pmoles/ $10^5$  células) disminuyeron significativamente ( $p < 0,01$ ) tras la inhibición de la AC con SQ22536 ( $0,75 \pm 0,06$  pmoles/ $10^5$  células). El tratamiento con HU210 tuvo un efecto parecido ( $0,84 \pm 0,06$  pmoles/ $10^5$  células), mientras que la combinación de ambos indujo una reducción aún mayor de los niveles de AMPc ( $0,84 \pm 0,06$  pmoles/ $10^5$  células). Lo que sugiere que no toda la actividad de adenilato ciclasa está bajo el control de los receptores CB1. En conjunto, estos datos indican que el silenciamiento requiere una reducción drástica en los niveles de AMPc celulares a pesar del amplio rango dinámico de los niveles de este nucleótido ya que la activación de la adenilato ciclasa con forskolina ( $50\mu\text{M}$ , 15min) incrementa los niveles del nucleótido unas 70 veces sobre el nivel basal ( $89,07 \pm 12,64$  pmoles/ $10^5$  células). Estos resultados que relacionan el silenciamiento presináptico con niveles de AMPc bajos en la célula concuerdan con el hecho que el AMPc aumente el número de botones sinápticos funcionales (Ma *et al.*, 1999). Además, experimentos previos del laboratorio han demostrado que el tratamiento con forskolina previene el silenciamiento inducido por HU210 (Ramirez-Franco *et al.*, 2014), sugiriendo la reducción en los niveles de AMPc como posible responsable del silenciamiento de botones sinápticos.

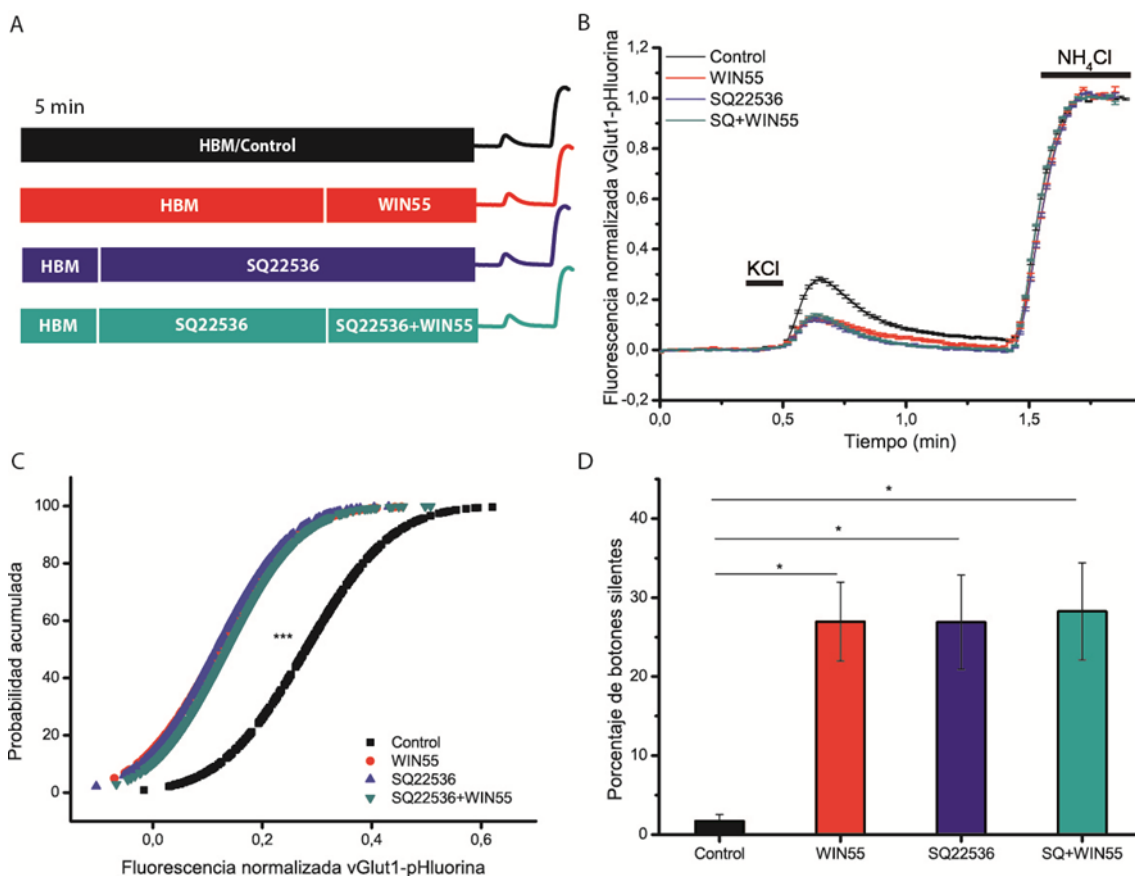
## RESULTADOS



**Figura IV-11.** La inhibición de la adenilato ciclasa con SQ22536 también induce el silenciamiento presináptico y ocluye el inducido por HU210. A) Protocolo experimental. B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 (5μM, 10 min); SQ22536 (100μM, 25min); SQ22536 + HU210. (Control N=6, n=267; HU210 N=8, n=434; SQ22536 N=7, n=367; SQ+HU210 N=8, n=558; N, n° de cubreobjetos; n, n° de botones sinápticos). C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales. D) Porcentajes de botones silentes. ANOVA con test de Bonferroni, \*\*p<0,01, \*\*\*p <0,001. E) Niveles de AMPc (pmoles/10<sup>5</sup> células) en las distintas condiciones: Control; HU210; SQ22536; SQ+HU210 y tras la adición de forskolina (50μM, 15min). El símbolo \* indica la comparación entre los niveles basales frente al resto de tratamientos, mientras que # indica la comparación de forskolina con a otros tratamientos, \*\* o ## p < 0,01, mientras que \*\*\* es p < 0,001 (test de Welch).

La activación de los receptores CB1 con el agonista cannabinoide el WIN55512 (5μM, 10min) produjo resultados comparables a los obtenidos con HU210. WIN55512 redujo la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos (Figura IV-12B, C) y aumentó significativamente (p<0,05) el porcentaje de botones silentes (27,0±5,0%) en comparación con el control (1,7±0,9%) (Figura IV-12D). El inhibidor de la adenilato ciclasa SQ22536 silenció los botones sinápticos (26,9±5,9%) en magnitud comparable a la observada con WIN55512 y cuando SQ22536 se añadió antes del agonista cannabinoide también ocluyó la respuesta de WIN55512

( $28,3 \pm 6,1\%$ ) lo que refuerza la idea de que el silenciamiento presináptico está asociado a una disminución de los niveles de AMPc.

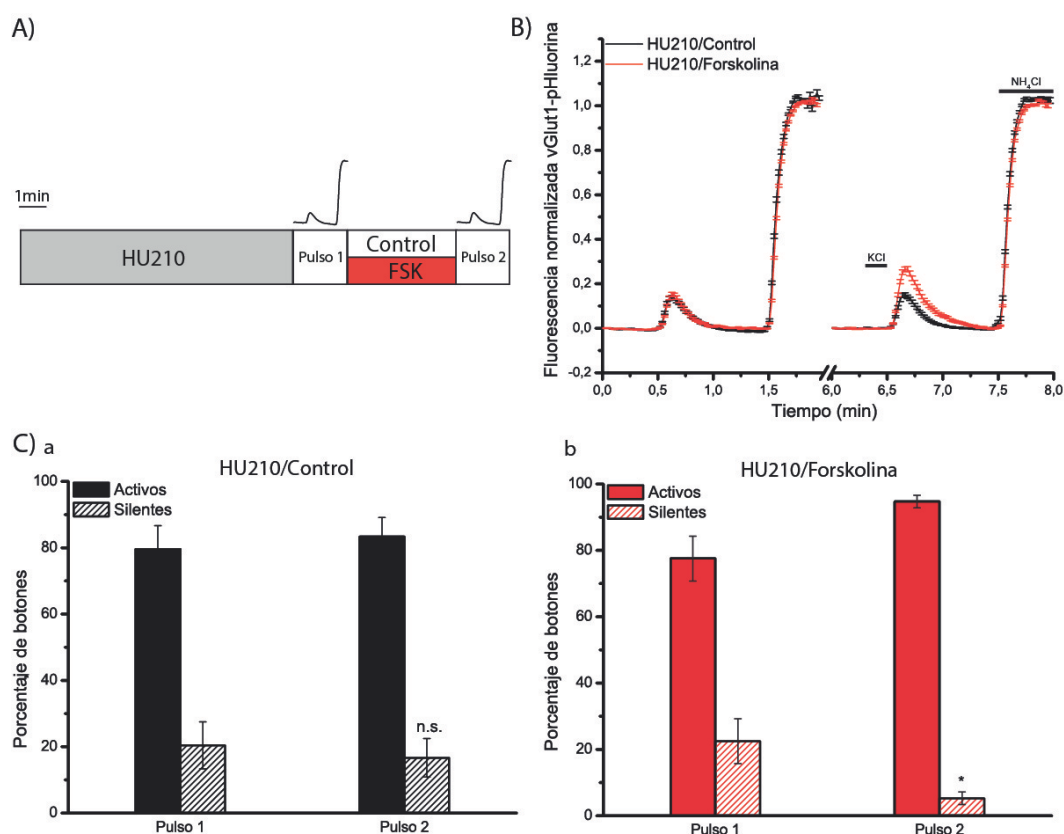


**Figura IV-12.** La inhibición de la adenilato ciclada con SQ22536 también induce el silenciamiento presináptico y ocluye el inducido por WIN55512. A) Protocolo experimental. B) Respuesta de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en condiciones control y tras el tratamiento con WIN55512 (5 $\mu\text{M}$ , 10min); SQ22536 (concentración, tiempo); SQ22536 + WIN55512. (Control: N=6, n=331; WIN55512: N=6, n=203; SQ22536: N=6, n=282; SQ+WIN55512: N=6, n=451; N, n° de cubreobjetos; n, n° de botones sinápticos). C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales. D) Porcentajes de botones silentes. ANOVA con test de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 8. El aumento de los niveles de AMPc acelera la reversión del silenciamiento

Dado que el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides es un fenómeno transitorio que se revierte completamente 20min después de la retirada del agonista, nos preguntamos si la elevación de los niveles de AMPc con forskolina era capaz de acelerar la activación de botones silenciados previamente por el tratamiento con HU210. Con este objetivo, realizamos experimentos con dos pulsos de despolarización. Las células se trataron con HU210 (5 $\mu\text{M}$ , 10min) y a continuación se sometieron a un primer pulso de despolarización con KCl para identificar los botones silenciados y tras un periodo de lavado o de aplicación de forskolina (50 $\mu\text{M}$ ) de 4min se aplicó un segundo pulso de KCl para identificar la fracción los botones silenciados

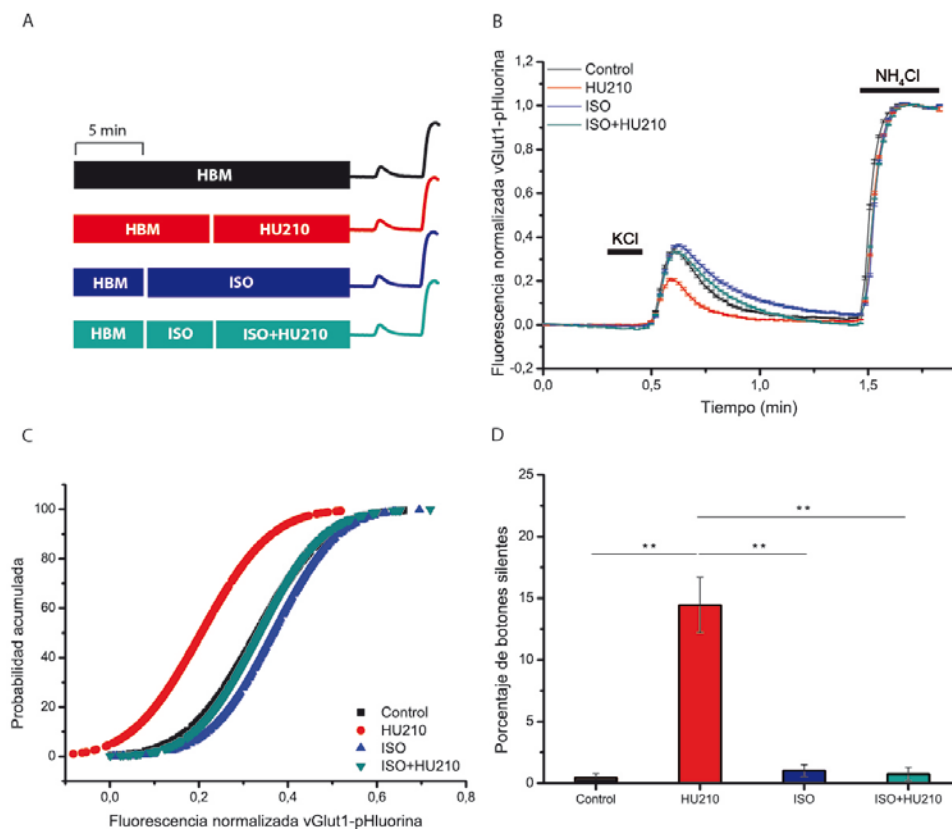
que respondía a un segundo estímulo (Figura IV-13A). Tras el tratamiento con HU210 la respuesta de exocitosis-endocitosis inducida por un primer pulso de KCl fue de sólo un  $14,2 \pm 0,9\%$  de la inducida por el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Figura IV-13B) debido al incremento de los botones silentes ( $20,4 \pm 7,1\%$  en la serie control y  $22,5 \pm 6,8\%$  en la serie de forskolina) (Figura IV-13Ca,Cb). Tras el periodo de lavado, un segundo pulso de despolarización con KCl reveló que alguno de los botones silenciados previamente respondieron ya a este segundo estímulo disminuyendo por tanto el porcentaje de botones silentes ( $16,7 \pm 5,8\%$ ) aunque este cambio no fue significativo ( $p > 0,05$ ) (Figura IV-13Ca). Sin embargo, una segunda despolarización, tras la aplicación de forskolina puso de manifiesto un bajo porcentaje de botones silentes ( $5,3 \pm 1,9\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura IV-13Cb) indicando que el incremento en los niveles de AMPc con forskolina acelera la activación de los botones previamente silenciados por HU210. Luego, el incremento de los niveles de AMPc es capaz no sólo de prevenir el silenciamiento, sino también de acelerar la activación de botones silenciados previamente.



**Figura IV-13.** El incremento en los niveles de AMPc con forskolina acelera la activación de los botones previamente silenciados por HU210. A) Protocolo experimental. B) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en las distintas condiciones: HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min) + control y HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min) + forskolina ( $50\mu\text{M}$ , 4min). Registros a la izquierda (primer pulso de despolarización); Registros a la derecha (segundo pulso de despolarización). Los datos fueron obtenidos a partir de (HU210/Control:  $N=4$ ,  $n=144$ ; y HU210/Forskolina:  $N=5$ ,  $n=212$ ).  $N$ , nº de cubreobjetos y  $n$ , nº de botones sinápticos analizados. C) Comparación de los porcentajes de botones activos y silentes en a-Control y b-Forskolina. Diagramas a la izquierda (primer pulso de despolarización); Diagramas a la derecha (segundo pulso de despolarización). t de Student, \*  $p < 0,05$ .

## 9. Otros GPCRs podrían afectar el silenciamiento

A la vista del papel central de los niveles de AMPc como determinante del estado activo/silente de los botones sinápticos del cultivo de neuronas granulares y del hallazgo de que un incremento de los niveles de AMPc con forskolina previene el silenciamiento inducido por los cannabinoides, determinamos si la activación de un receptor acoplado a la proteína Gs como los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) era también capaz de prevenir el silenciamiento inducido por HU210. Para ello las células se incubaron con el agonista de estos receptores isoproterenol (100 $\mu$ M) (Figura IV-14A). La adición de isoproterenol aumentó ligeramente la respuesta de exocitosis endocitosis promedio de los botones sinápticos (Figura IV-14B, C), mientras que el número de botones silentes se mantuvo en niveles bajos  $1,0 \pm 0,5\%$ , similares ( $p > 0,05$ ) a los de las células control ( $0,5 \pm 0,3\%$ ) (Figura IV-14D). En cambio, el tratamiento con isoproterenol antes de la adición de los cannabinoides anuló ( $p < 0,05$ ) los efectos de HU210 en la respuesta exocitótica (Figura IV-14B, C) y revirtió completamente ( $0,8 \pm 0,5\%$ ) ( $p < 0,05$ ) el incremento en el número de botones silentes causado por HU210 ( $14,5 \pm 2,2\%$ ) (Figura IV-14D). Por tanto, la activación de receptores acoplados a proteínas Gs como los beta adrenérgicos y el incremento en los niveles de AMPc subsiguiente revierten las acciones de los receptores de cannabinoides en la capacidad exocitótica-endocitótica de los botones sinápticos.



**Figura IV-14.** El agonista de los receptores beta adrenérgicos isoproterenol previene el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides. A) Protocolo experimental. B), Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos



los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en las distintas condiciones: Control; HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10 min); isoproterenol ( $100\mu\text{M}$ , 15min) e ISO/HU210. Los datos fueron obtenidos a partir del siguiente nº de cubreobjetos (N) y botones sinápticos (n) analizados. Control: N=6, n=378; HU210: N=7, n=387; Iso: N=6, n=387; Iso/HU210: N=6, n=508 C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas de exocitosis-endocitosis en las distintas condiciones. D) Comparación de los porcentajes de botones silentes en las diferentes condiciones experimentales. ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn, \*\*  $p < 0,01$ .

## 10. Epac2 está implicada en la prevención del silenciamiento presináptico

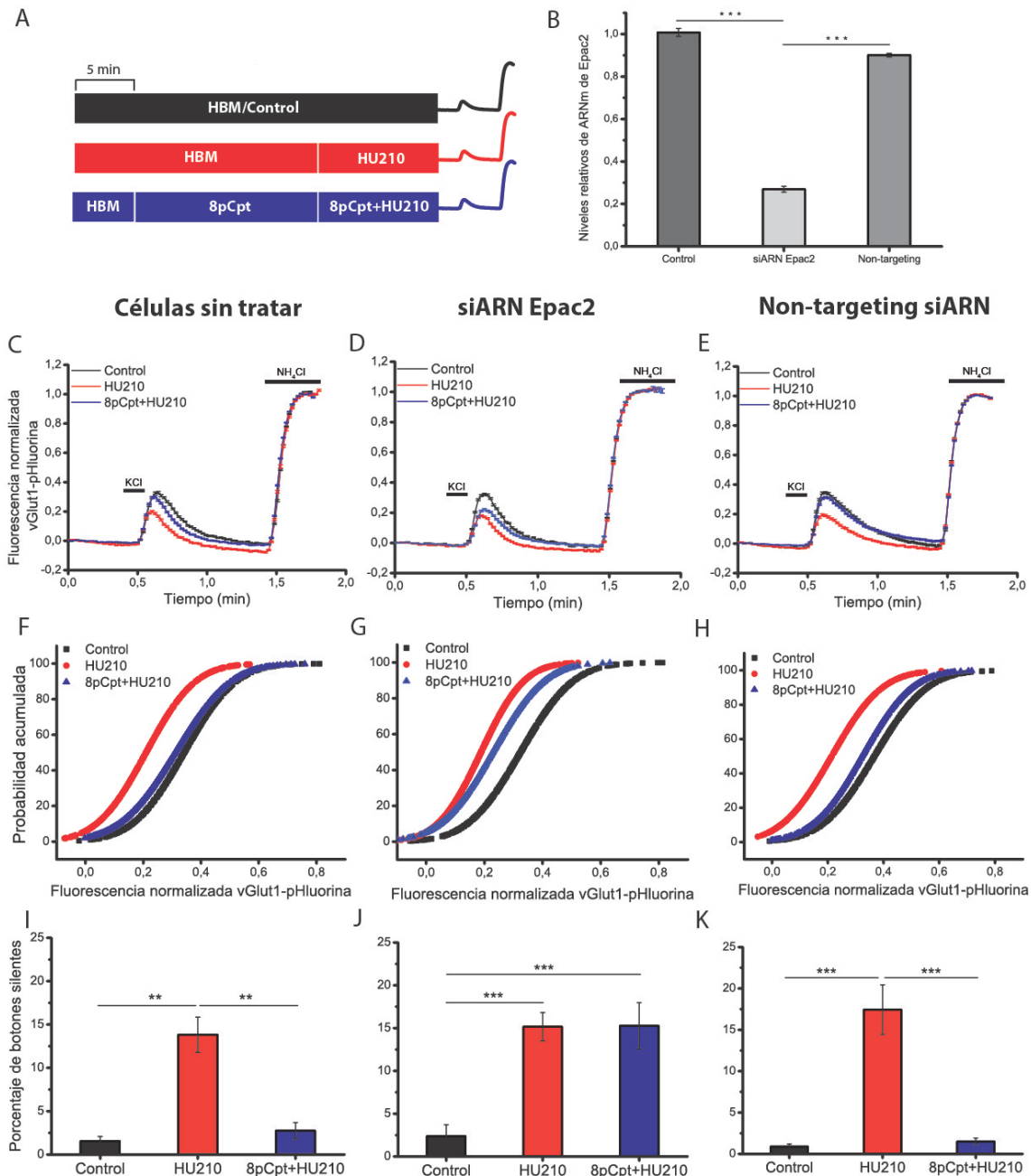
Resultados previos de este laboratorio han mostrado que la elevación de los niveles de AMPc con forskolina previene el silenciamiento inducido por HU210. Ahora bien, en esta acción el nucleótido activa una vía diferente a la clásica de la proteína kinasa A (PKA) (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). El hecho de que la reversión por forskolina del silenciamiento inducido por los cannabinoides fuera insensible al inhibidor de la PKA H-89 y que la acción de la forskolina fuera mimetizada por el activador de proteínas Epac 8pCPT, implica a la proteína Epac, factor intercambiador de nucleótidos de guanina dependiente de AMPc (Seino y Shibasaki 2005) en la reversión por AMPc del silenciamiento presináptico (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Epac presenta dos isoformas: Epac1 que tiene un nivel de expresión bajo en el SNC, mientras que Epac2 tiene una expresión abundante en el cerebro y en el cerebelo (Kawasaki *et al.*, 1998). Epac1 y Epac2 son proteínas multidominio consistentes en una región N-terminal reguladora y otra C-terminal catalítica (Seino y Shibasaki 2005; Grandoch *et al.*, 2010).

Para poder estudiar si la actividad de Epac2 es un determinante del estado activo/silente de los botones sinápticos, realizamos experimentos para silenciar la expresión del gen de Epac2 con ARN pequeño de interferencia (siARN, del inglés *small interfering* ARN). El tratamiento con siARN de Epac2 durante 72h (a 4DIV) redujo a un  $26,7 \pm 1,0\%$  del control el nivel del ARN mensajero de Epac2, mientras un tratamiento similar con un siARN inespecífico utilizado como control, apenas tuvo efecto ( $89,1 \pm 1,0\%$ ) (Figura IV-15B).

A nivel funcional nos planteamos estudiar si la reducción de la expresión de Epac2 aumentaba el porcentaje de botones silentes y si afectaba a la capacidad del activador de Epac 8pCpt de prevenir el silenciamiento inducido por HU210. La respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de los botones sinápticos inducida por la despolarización con KCl en las células granulares (Figura IV-15C, F) se redujo tras el tratamiento con HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min) como consecuencia del aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del número de botones silentes desde un  $1,6 \pm 0,5\%$  en el control a un  $13,8 \pm 2,0\%$  en las células tratadas con HU210 (Figura IV-15I). En las células no tratadas, el activador de proteínas Epac 8pCpt ( $50\mu\text{M}$ , 25min) previno completamente, tanto la disminución de la respuesta de exocitosis-endocitosis (Figura IV-15C, F) como el aumento del número de los botones silentes inducidos por HU210 (Figura IV-15I). Sin

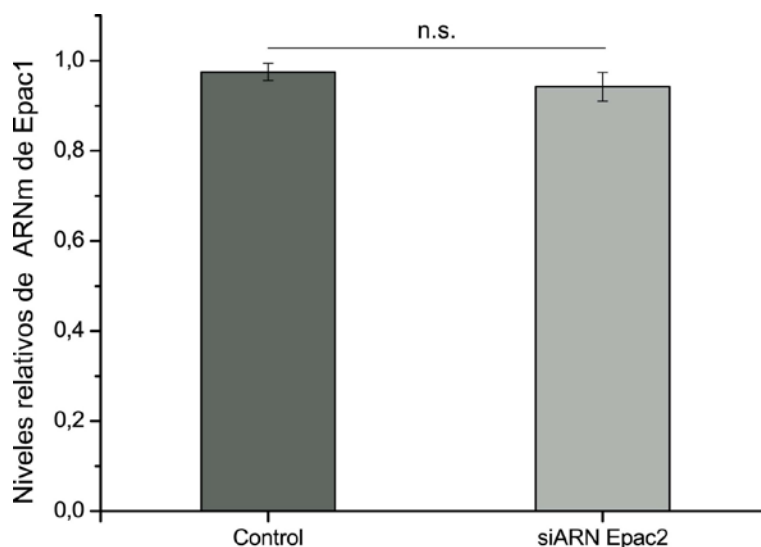
embargo, en las células tratadas con siARN para reducir la expresión del gen de Epac2 (Figura IV-15B) 8pCpt no previno ni la disminución de la respuesta de exocitosis-endocitosis (Figura IV-15D, G) ni el aumento en el porcentaje de botones silentes inducidos por el agonista cannabinoide HU210 (Control  $2,4 \pm 1,3\%$ ; HU210  $15,5 \pm 1,7\%$ ; HU210+8pCpt  $15,3 \pm 2,7\%$ ). Por otro lado, las células tratadas con el siARN de secuencia diana aleatoria utilizado como control se comportaron como las células no tratadas, observándose que 8pCpt previno tanto la disminución de la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio (Figura IV-15E, H), como el aumento en el número de botones silentes (Figura IV-15K) inducidos por el agonista cannabinoide HU210 (Control  $0,9 \pm 0,3\%$ ; HU210  $17,4 \pm 3,0\%$ ; HU210+8pCpt  $1,5 \pm 0,4\%$ ). Hay que señalar, no obstante, que el número de botones silentes en condiciones basales aumento 2,5 veces en las células tratadas con el siARN de Epac2, aunque este cambio no fue significativo ( $p > 0,5$ , test de Welch), posiblemente por la expresión residual de Epac2 tras el tratamiento con el siARN (Figura IV-15I, J).

## RESULTADOS



**Figura IV-15.** La supresión de la expresión de Epac2 con siARN produce un aumento no significativo del silenciamiento, pero previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210. A) Protocolo experimental. B) Niveles relativos del ARNm de Epac2 en condiciones control y tras los tratamientos con siARN de Epac2 (siARN Epac2) y con una secuencia aleatoria o control negativo (Non-targeting) (Control: N=3, siARN Epac2: N=3, Non-targeting: N=3). ANOVA con test de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$ . C, D y E) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en condiciones control, tras el tratamiento con HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10 min) y con 8pCpt ( $50\mu\text{M}$ , 25min)+HU210 en células sin tratar (C), células tratadas con siARN de Epac2 (D), y células tratadas con ARN inespecífico “non targeting” (E) determinadas en: Células sin tratar: control N=6, n=354; HU210 N=8, n=404; HU210+8pCpt N=7, n=489. Células tratadas con siARN de Epac2: Control N=7, n=458; HU210 N=10, n=567; HU210+8pCpt N=10, n=618 botones. Células tratadas con siRNA inespecífico “non-targeting”: Control N=7, n=445; HU210 N=8, n=434; HU210+8pCpt N=7, n=556, N, nº de cubreobjetos analizados; n, nº de botones sinápticos analizados. F,G y H) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales de los botones sinápticos de las células sin tratar (F), células tratadas con siARN de Epac2 (G) y de las células tratadas con siARN inespecífico “non targeting” (H). I,J y K), Porcentaje de botones silentes en las células sin tratar (I), células tratadas con siARN de Epac2 (J) y células tratadas con un siARN inespecífico “non targeting” (K). ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

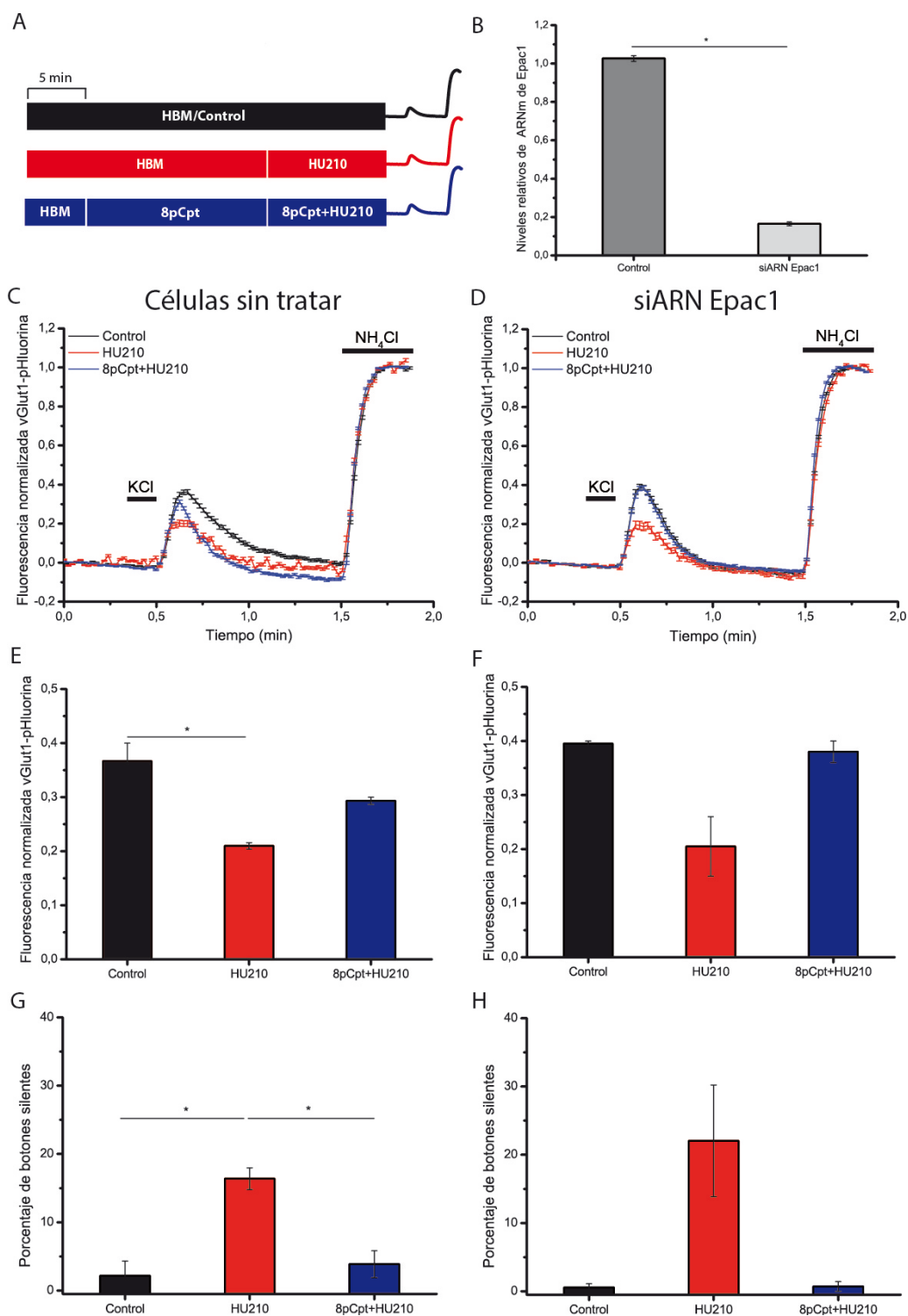
También determinamos si el silenciamiento de Epac2 afectaba los niveles de expresión de Epac1. En la Figura IV-16 se puede observar que los niveles del ARN mensajero de Epac1 en las células control y en las células tratadas con el siARN de Epac2 son similares.



**Figura IV-16.** El tratamiento con siARN de Epac1 no altera los niveles del ARNm de Epac2. Niveles relativos de ARN mensajero de Epac1 en condiciones control y tras el tratamiento con ARN de silenciamiento de Epac2 (siARN Epac2) (Control N=2, 0,98±0,02, siARN Epac2 N=2, 0,94±0,03). t de Student, <sup>n.s.</sup> p>0,05.

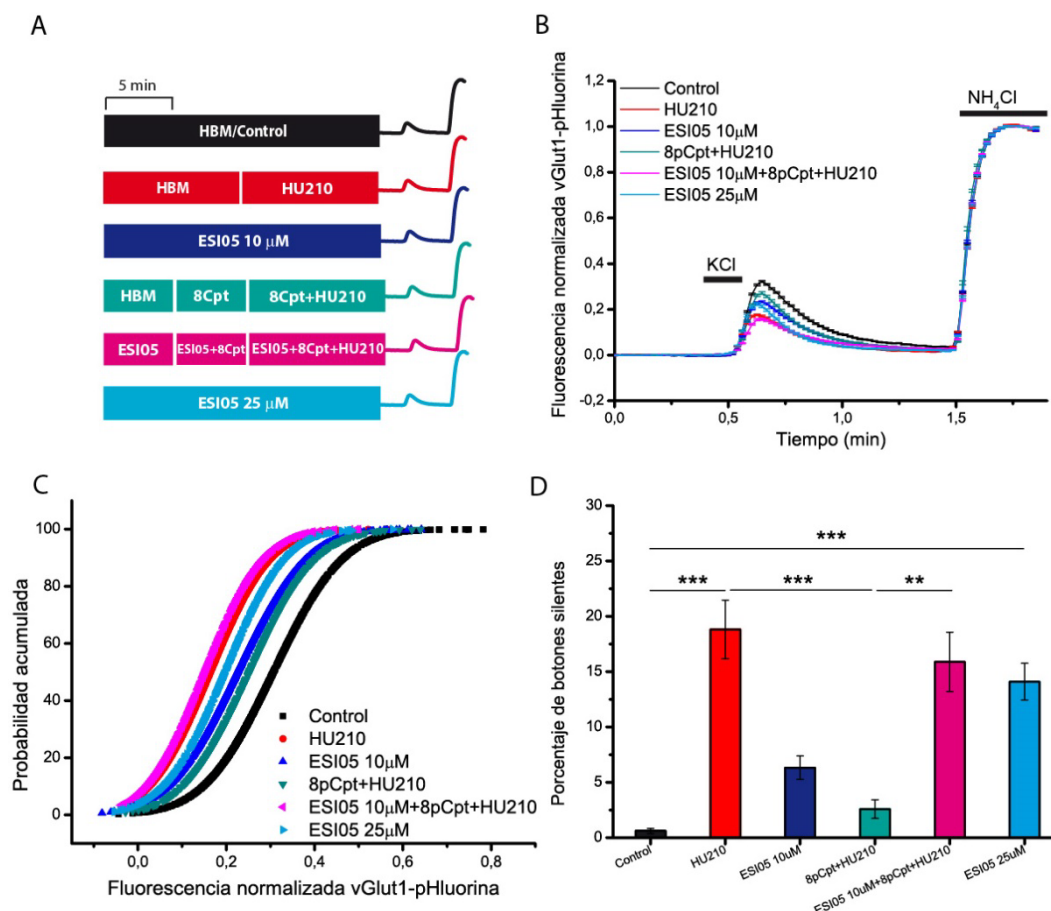
Aunque Epac2 es la isoforma más abundante en cerebro en comparación con Epac1 (Kawasaki *et al.*, 1998) también realizamos un experimento preliminar con siARN de la proteína Epac1 para ver si la reducción de la expresión de Epac1 aumentaba el porcentaje de botones silentes y afectaba a la capacidad del activador de Epac 8pCpt de prevenir el silenciamiento inducido por HU210 (Figura IV-17A). El tratamiento con el siARN de Epac1 redujo los niveles de ARNm (Control 1,03±0,02; siARN Epac1 0,17±0,01) (Figura IV-17B). En primer lugar observamos que la respuesta de exocitosis-endocitosis inducida por KCl en las células sin tratar (Figura IV-17C, E) fue similar a la obtenida en las células tratadas con siARN de Epac1 (Figura IV-17D, F). El tratamiento con siARN de Epac1 tampoco incrementó el número de botones silentes: 2,2±2,2% en las células sin tratar (Figura IV-17G) y 0,6±0,6% en las células tratadas con siARN de Epac1 (Figura IV-17H). HU210 también redujo en cuantía similar la respuesta exocitótica en las células no tratadas (Figura IV-17C, E) y en las células tratadas con siARN de Epac1 (Figura IV-17D, F) y aumentó el porcentaje de botones silentes, tanto en las células sin tratar (control: 2,2±2,2%; HU210: 16,4±1,6%, Figura IV-17G) como en las células tratadas con siARN de Epac1 (Control: 0,6±0,6%; HU210: 22,1±8,2%, Figura IV-17H). Además, el tratamiento con siARN de Epac1 no alteró la capacidad del activador específico de Epac 8pCpt de prevenir el silenciamiento inducido por HU210 (Figura IV-17H). Por tanto, los datos obtenidos tras la reducción de la expresión de Epac1 sugieren que esta isoforma no está implicada en el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides en las células granulares de cerebelo de rata.

## RESULTADOS



**Figura IV-17.** La supresión de la expresión de Epac1 con siARN no aumenta el silenciamiento, ni previene la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210. A) Protocolo experimental. B) Niveles relativos del ARNm de Epac1 en condiciones control y tras el tratamiento con siARN de Epac1 (siARN Epac1). C, D) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en condiciones control, tras el tratamiento con HU210 (5μM, 10 min); y con HU210 + 8pCpt (50μM, 25 min) en células sin tratar (C), células tratadas con siRNA de Epac1 (D), determinadas en: células no tratadas: control N=3, n=145; HU210 N=3, n=102; HU210+8pCpt N=3, n=165. Células tratadas con siARN de Epac2: Control N=2, n=155; HU210 N=2, n=79; HU210+8pCpt N=2, n=140. N, n° de cubreobjetos analizados; n, n° de botones sinápticos analizados. E, F, Cuantificación de las respuestas mostradas C) y D) de las células sin tratar (E) y células tratadas con siRNA de Epac1 (F). G, H) Porcentaje de botones silentes en las células sin tratar (G) y en las células tratadas con siRNA de Epac1 (H). ANOVA con test de Bonferroni, \* p<0,05.

El hecho de que el siARN de Epac2 anule la acción del activador de Epac 8pCpt de prevenir el silenciamiento presináptico inducido por HU210 sugiere la implicación de esta proteína. Sin embargo, el siARN de Epac2 no incrementó significativamente el número de botones sinápticos silentes en estas células probablemente por la actividad remanente de Epac2. Con el fin de profundizar en el papel de Epac2 en este fenómeno de silenciamiento presináptico utilizamos una aproximación farmacológica para inhibir completamente la actividad de Epac2. Realizamos experimentos con el inhibidor selectivo de Epac2 ESI-05, desarrollado recientemente (Tsalkova *et al.*, 2012). La inhibición específica de Epac2 por este fármaco se debe a la unión de ESI-05 a una región entre los dos dominios de unión a AMPc (CBDs) que es exclusiva de Epac2 y que bloquea a la proteína en su conformación autoinhibitoria (Tsalkova *et al.*, 2012). La adición de ESI-05 (10 $\mu$ M, 20min) (Figura IV-18A) causó una reducción en la respuesta exo-endocitótica promedio inducida por la despolarización con KCl (Figura IV-18B, C) y aumentó aunque no significativamente ( $p>0,05$ ) el número de botones silentes ( $6,3\pm1,1\%$ ) en comparación con el control ( $0,6\pm0,2\%$ ). La aplicación de una concentración de ESI-05 mayor (25 $\mu$ M, 20min) también causó una reducción en la respuesta exo-endocitótica promedio inducida por la despolarización con KCl (Figura IV-18B, C) y además aumentó significativamente ( $p<0,05$ ) el número de botones silentes ( $14,1\pm1,7\%$ ) (Figura IV-18D). El silenciamiento presináptico inducido por ESI-05 25 $\mu$ M fue similar ( $p>0,05$ ) al inducido por el agonista cannabinoide HU210 ( $18,8\pm2,7\%$ ; Figura 18D). Curiosamente concentraciones bajas de ESI-05 (10 $\mu$ M) fueron suficientes para anular la prevención por 8pCpt del silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides ( $15,9\pm2,7\%$ , Figura IV-18D). Por tanto, estos datos de nuevo parecen indicar que la inducción del silenciamiento requiere una fuerte inhibición de la actividad de Epac2.



**Figura IV-18.** El inhibidor de Epac2 ESI05 produce un aumento significativo del silenciamiento y previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210. A) Protocolo experimental. (B) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en las distintas condiciones: control, HU210 (5  $\mu$ M, 10 min); ESI05 (10  $\mu$ M, 20 min); ESI05 (25  $\mu$ M, 20 min); 8pCpt (50  $\mu$ M, 15 min) + HU210; ESI05 + 8pCpt + HU210, determinadas en Control: N=13, n=1057; HU210: N=15, n=1031; ESI-05 (10  $\mu$ M) N=15, n=976; ESI05 (25  $\mu$ M): N=6, n=447; 8pCpt+HU210: N=9, n=554; ESI-05+8pCpt+HU210: N=9, n=561; N, n° de cubreobjetos analizados; n, n° de botones sinápticos analizados. C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales de los botones sinápticos en las distintas condiciones. D) Porcentaje de botones silentes en las distintas condiciones. ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn, \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

## 11. La activación de Epac2 también acelera la reversión del silenciamiento

Dado que la inhibición de la proteína Epac2 con ESI-05 induce el silenciamiento presináptico y que por otro lado la activación de las proteínas Epac con 8pCpt previene el silenciamiento inducido por los cannabinoides (Ramirez-Franco *et al.*, 2014) nos planteamos si la activación de Epac con 8pCpt acelera la reversión del silenciamiento inducido por los cannabinoides. Con este fin, se realizaron experimentos de doble pulso con un protocolo similar al ya descrito y se observó que el porcentaje de botones silentes tras 4 min de perfusión de 8pCpt, fue significativamente menor ( $21,7 \pm 4,1\%$  y  $6,4 \pm 1,5\%$  tras el primer y segundo pulso respectivamente,  $p < 0,05$ , Figura IV-19Cb) que en presencia de medio HBM ( $25,8 \pm 3,1\%$  y  $19,7 \pm 2,7\%$ ,  $p > 0,05$ , Figura IV-19Ca). Por

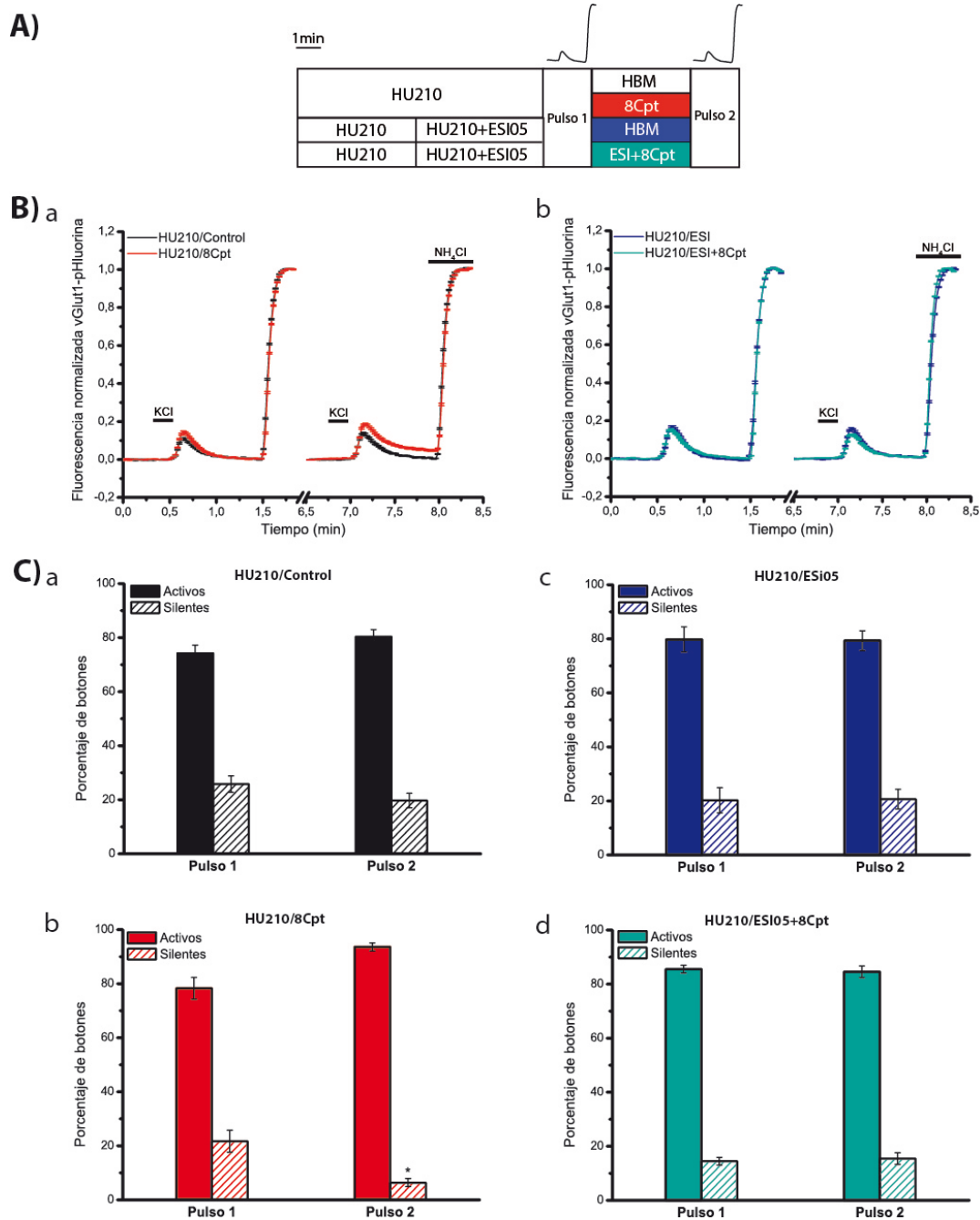
tanto, la recuperación de las respuestas de exocitosis-endocitosis promedio que se observa con 8pCpt (Figura IV-19Ba) es debida a un incremento en el porcentaje de botones activos ( $78,3 \pm 4,1\%$  y  $93,6 \pm 1,5\%$ ,  $p < 0,05$ , antes y después de 8pCpt, respectivamente, Figura IV-19Cb).

Nos planteamos también si Epac2 mediaba en la reactivación acelerada por 8pCpt de los botones sinápticos silenciados por HU210. Por lo que diseñamos experimentos de reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210 incluyendo el inhibidor específico de Epac2 ESI05 ( $10 \mu\text{M}$ ). En estas condiciones 8pCpt no disminuyó ( $p > 0,05$ ) el número de botones silentes tras el segundo pulso de despolarización ( $15,4 \pm 2,2\%$ ) que fue similar al obtenido en el primer pulso ( $14,5 \pm 1,5\%$ ; Figura IV-19Cd). Consecuentemente, en este caso 8pCpt no aumentó la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio (Figura IV-19Bb) ni el número de botones activos ( $85,5 \pm 1,5\%$  y  $84,6 \pm 2,2\%$ ,  $p > 0,05$ , antes y después de la adición de 8pCpt, respectivamente, Figura IV-19Cd).

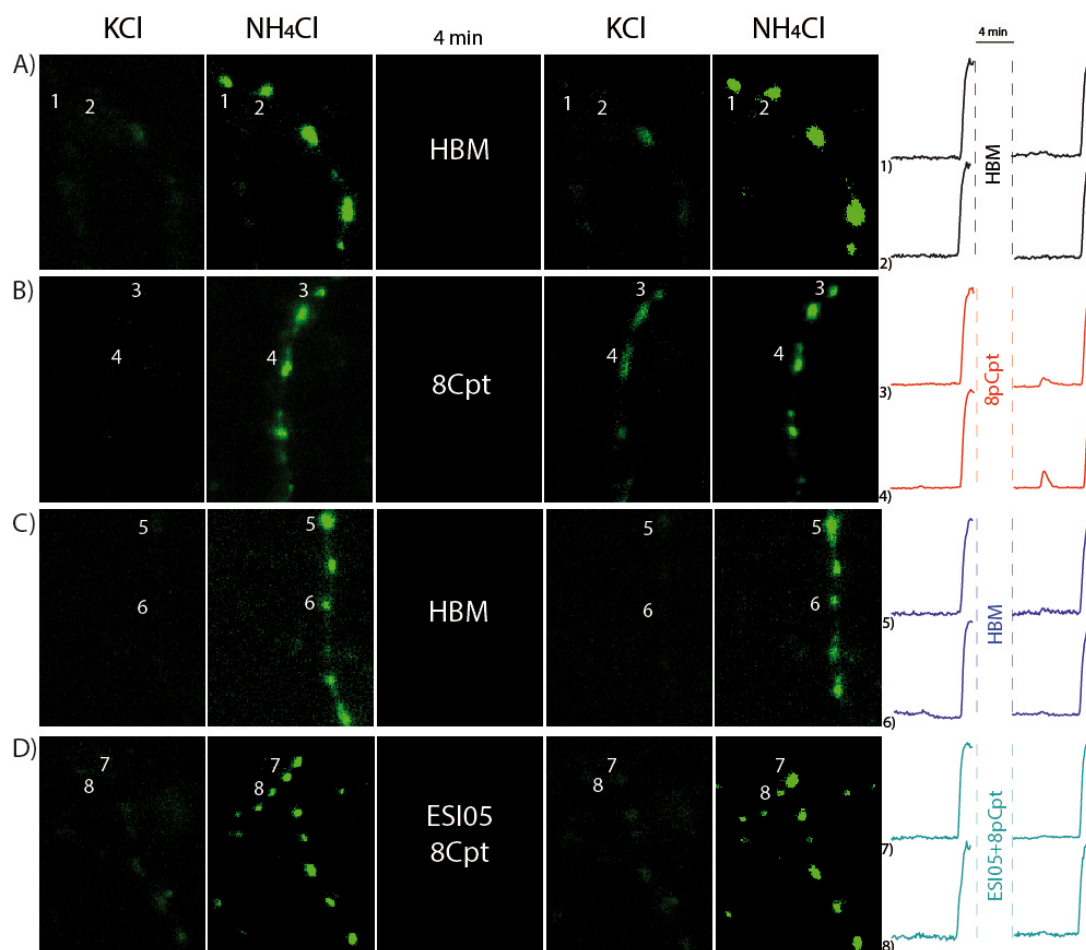
La Figura IV-20 muestra imágenes de fluorescencia de vGlut1-pHluorina tras el primer y el segundo pulso de despolarización con KCl seguido en ambos casos de la aplicación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en las distintas condiciones, con algunos ejemplos individuales (Figura IV-20). Se puede observar tras la aplicación de 8pCpt la respuesta de botones previamente silenciados por HU210 (Figura IV-20B).



## RESULTADOS



**Figura IV-19.** El inhibidor específico de Epac 2, ESI05, previene la reactivación acelerada por 8pCpt de los botones sinápticos silenciados por HU210. A) Protocolo experimental. B) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en las distintas condiciones: HU210 (5 $\mu\text{M}$ , 10min) + control; HU210 (5 $\mu\text{M}$ , 10min) + 8pCpt (50 $\mu\text{M}$ , 4min); HU210 (5 $\mu\text{M}$ , 10min)/ESI05 (10 $\mu\text{M}$ , 5min); HU210 (5 $\mu\text{M}$ , 10 min)/ESI05 (10 $\mu\text{M}$ , 9min) + 8pCpt (50 $\mu\text{M}$ , 4min). Registros a la izquierda (primer pulso de despolarización); Registros a la derecha (segundo pulso de despolarización). Los datos fueron obtenidos a partir de (HU210/Control: N=9, n=388; y HU210/8pCpt: N=8, n=416; HU210/ESI05: N=9, n=469; HU210/ESI05/8pCpt: N=9, n=592) (N, nº de cubreobjetos y n, nº de botones sinápticos analizados). C) Comparación de los porcentajes de botones activos y silentes en las distintas condiciones experimentales. Diagramas a la izquierda (primer pulso de despolarización); Diagramas a la derecha (segundo pulso de despolarización). \*p<0,05 t de Student.



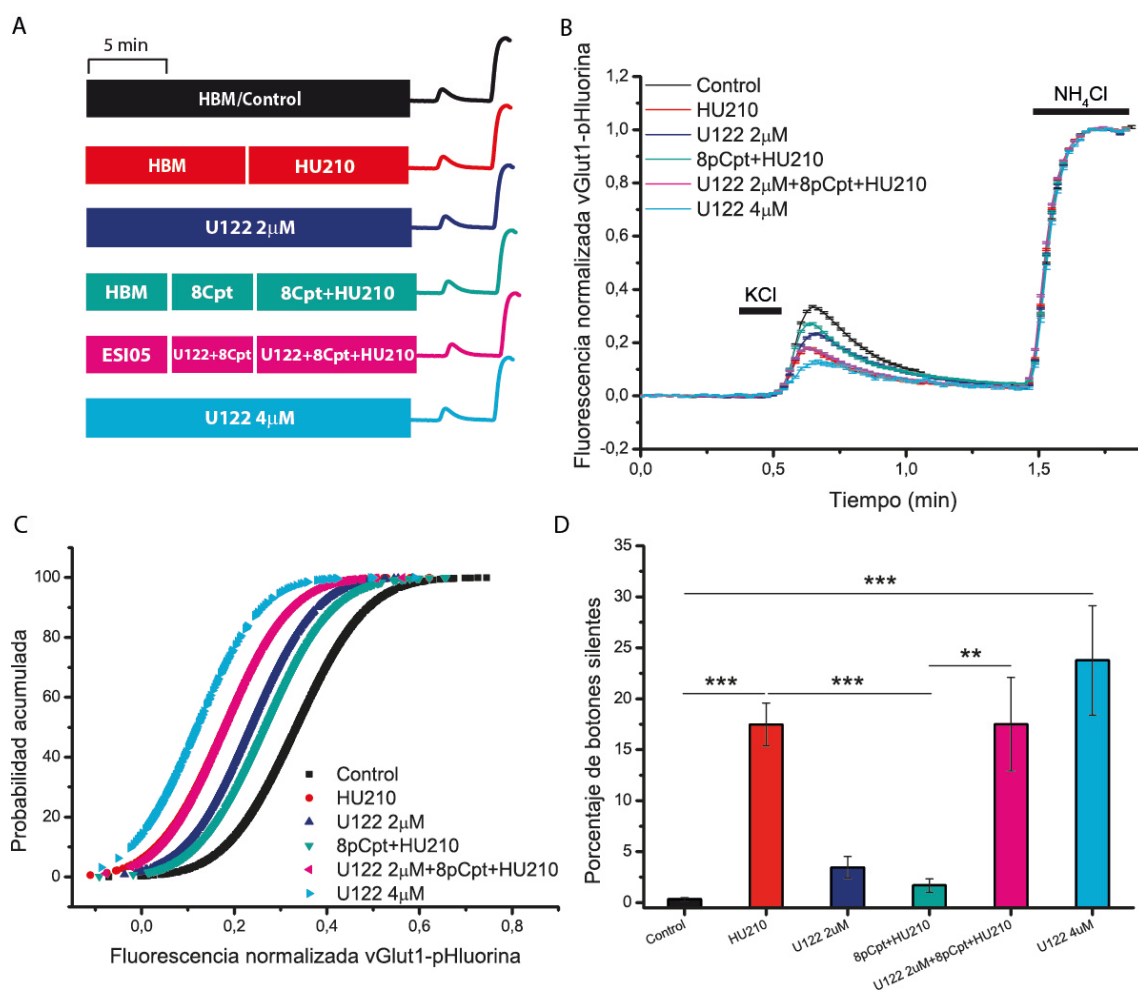
**Figura IV-20.** Imagen representativa de la fluorescencia de algunos botones sinápticos tras los dos pulsos de despolarización (KCl) y los dos pulsos de NH<sub>4</sub>Cl en las distintas condiciones experimentales mostradas en la Figura IV-20: A) HU210 (5μM, 10min) + control; B) HU210 (5μM, 10min) + 8pCpt (50μM, 4min); C) HU210 (5μM, 10min)/ESI05 (10μM, 5min) y D) HU210 (5μM, 10min)/ESI05 (10μM, 9min) + 8pCpt (50μM, 4min). A la derecha de cada serie de imágenes se muestran algunos registros de botones sinápticos individuales.

## 12. Epac2 podría afectar al silenciamiento mediante la activación de PLC

La inhibición de Epac2 aumenta el número de botones silentes, mientras que su activación acelera el despertar de botones previamente silenciados por la estimulación del receptor CB1. Esto sugiere que la señalización dependiente de AMPc mediada por Epac2 determina el estado activo/silente de los botones sinápticos en nuestro modelo de estudio. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de señalización de las proteínas Epac2 en la presinapsis en relación con la transmisión sináptica. Las proteínas Epac activadas por AMPc están implicadas en la potenciación de la transmisión sináptica (Gekel y Neher 2008; Fernandes *et al.*, 2015) y en la potenciación de la liberación de glutamato dependiente del receptor β-adrenérgico (Ferrero *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos exactos mediante los cuales Epac afecta a la exocitosis no están bien definidos. Las proteínas Epac han sido caracterizadas como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina dependientes de AMPc de GTPasas pequeñas como Rap1

(Kawasaki *et al.*, 1998) y Rab3A (Branham *et al.*, 2009). PLC $\epsilon$  es una diana directa de Rap1 (Schmidt *et al.*, 2001) y la potenciación de la secreción de insulina mediada por Epac2 depende de la actividad de PLC (Dzhura *et al.*, 2011). Además la activación de Epac aumenta la hidrólisis de PIP2 y ayuda translocar la proteína de la zona activa Munc13 a la membrana (Ferrero *et al.*, 2013).

Con el objetivo de saber si la actividad de PLC está implicada en la vía de señalización después de la activación de Epac realizamos experimentos de un pulso para determinar si la inhibición de la PLC aumentaba el número de botones silentes y/o afectaba la capacidad de 8pCpt para prevenir el silenciamiento inducido por el agonista de los receptores CB1 HU210. El tratamiento con U73122 (2 $\mu$ M, 20min) (Figura IV-21A) redujo la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio de los botones sinápticos respecto de las células control sin tratar (Figura IV-21B, C), seguramente por el aumento en el número de botones silentes desde  $0,3 \pm 0,2\%$  en el control hasta  $3,5 \pm 1,1\%$  con U-73122 (Figura IV-21D) aunque este incremento no alcanzó nivel de significación estadística,  $p > 0,05$ . Sin embargo, esta misma concentración de inhibidor de PLC anuló completamente ( $17,5 \pm 4,6\%$ ,  $p < 0,01$ ) la capacidad de 8pCpt de prevenir ( $1,7 \pm 0,7\%$ ,  $p < 0,05$ ) el silenciamiento inducido por los cannabinoides ( $17,5 \pm 2,1\%$ ) (Figura IV-21D). Por tanto, estos resultados muestran que se requiere una inhibición de PLC más fuerte para inducir el silenciamiento presináptico que para interferir con la capacidad de 8pCpt de prevenir el silenciamiento inducido por el agonista de los receptores CB1 HU210. Hecho que queda corroborado por el hallazgo de que concentraciones más altas de U73122 (4 $\mu$ M, 20min) inducen un grado de silenciamiento comparable ( $p < 0,001$ ) al del agonista cannabinoide HU210 ( $23,8 \pm 5,4\%$ ) (Figura IV-21D).

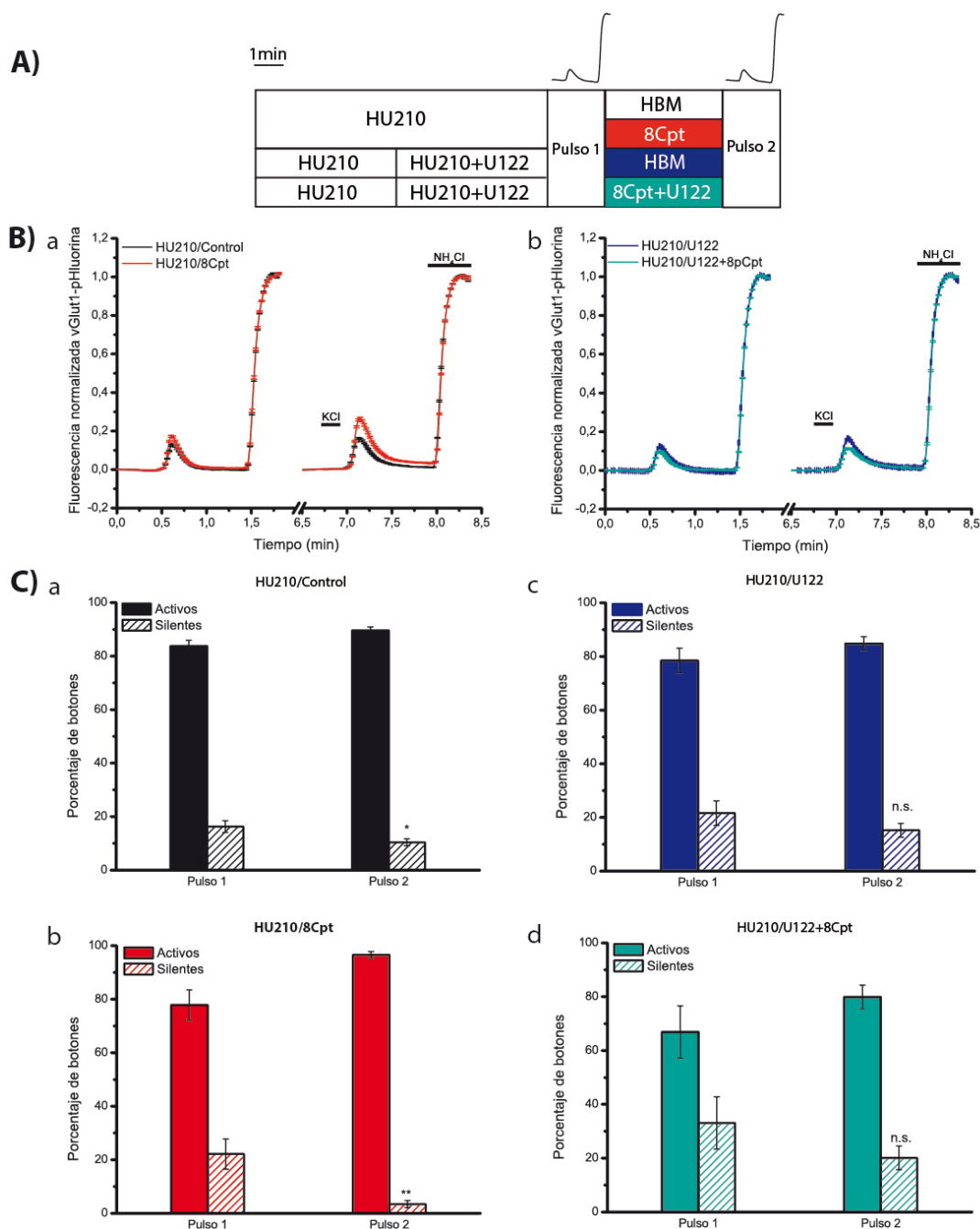


**Figura IV-21.** El inhibidor de PLC U-73122 produce un aumento significativo del silenciamiento y previene completamente la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210. A) Protocolo experimental. B) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en las distintas condiciones experimentales: control, HU210 (5μM, 10 min); U-73122 (2μM, 20min); U-73122 (4μM, 20min); 8pCpt (50μM, 15min) + HU210; ESI05 + 8pCpt + HU210. Datos obtenidos en, Control: N=16, n=1142; HU210: N=17, n=816; U73122 2μM, 20min N=17, n=846; U73122 4μM, 20min N=7, n=298; 8pCpt+HU210: N=13, n=828; U73122+8pCpt+HU210: N=14, n=935; N, nº de cubreobjetos analizados; n, nº de botones sinápticos analizados. C) Distribución de la probabilidad acumulada de las respuestas exo-endocitóticas individuales de los botones sinápticos en las distintas condiciones. D) Porcentaje de botones silentes en las distintas condiciones. ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn, \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Nos planteamos también si PLC participa en la reversión del silenciamiento. Para ello diseñamos experimentos de reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por HU210 incluyendo el inhibidor específico de PLC U73122 (2μM, 20min) (Figura IV-22A). Se realizaron experimentos de doble pulso en los que se observó que aunque 4 minutos de perfusión con medio HBM tras el primer pulso ( $16,3 \pm 2,2\%$ ) redujeron ya ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de botones silentes tras el segundo pulso ( $10,4 \pm 1,3\%$ ) (Figura IV-22Ca) esta reducción fue mucho mayor tras 4 minutos de perfusión de 8pCpt, (desde  $22,2 \pm 5,7\%$  hasta  $3,5 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,01$ , Figura IV-22Cb). En estas condiciones también se observa un aumento en la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio (Figura IV-22B) que es debida a un incremento en el porcentaje de botones activos de  $77,8 \pm 5,7\%$  a  $96,5 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,05$ , antes y después de 8pCpt, (Figura IV-22Cb). Sin embargo, en presencia del inhibidor de PLC U73122, 8pCpt no aceleró la reversión del

## RESULTADOS

silenciamiento ( $33,1 \pm 9,7\%$  y  $20,1 \pm 4,4\%$ ,  $p > 0,05$ , Figura IV-22Cd). Por tanto, la actividad de PLC también parece necesaria para la reversión por 8pCpt del silenciamiento inducido por los cannabinoides.



**Figura IV-22.** El inhibidor específico de PLC U73-122, previene la reactivación acelerada por 8pCpt de los botones sinápticos silenciados por HU210. A) Protocolo experimental. B) Respuestas de exo-endocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en las distintas condiciones: HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min)+control; HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min)+8pCpt ( $50\mu\text{M}$ , 4min); HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min)/U73122 ( $2\mu\text{M}$ , 5min); HU210 ( $5\mu\text{M}$ , 10min)/U73122 ( $2\mu\text{M}$ , 9min)+8pCpt ( $50\mu\text{M}$ , 4min). Registros a la izquierda (primer pulso de despolarización); Registros a la derecha (segundo pulso de despolarización). Los datos fueron obtenidos a partir de (HU210/Control:  $N=8$ ,  $n=352$ ; HU210/8pCpt:  $N=8$ ,  $n=413$ ; HU210/U122  $N=8$ , 263 botones; HU210/U73122 + 8pCpt:  $N=8$ ,  $n=462$ ). N,  $n^\circ$  de cubreobjetos y  $n, n^\circ$  de botones sinápticos analizados. C) Comparación de los porcentajes de botones activos y silentes en las distintas condiciones experimentales. Diagramas a la izquierda (primer pulso de despolarización); Diagramas a la derecha (segundo pulso de despolarización). n.s.  $p > 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  t de Student.

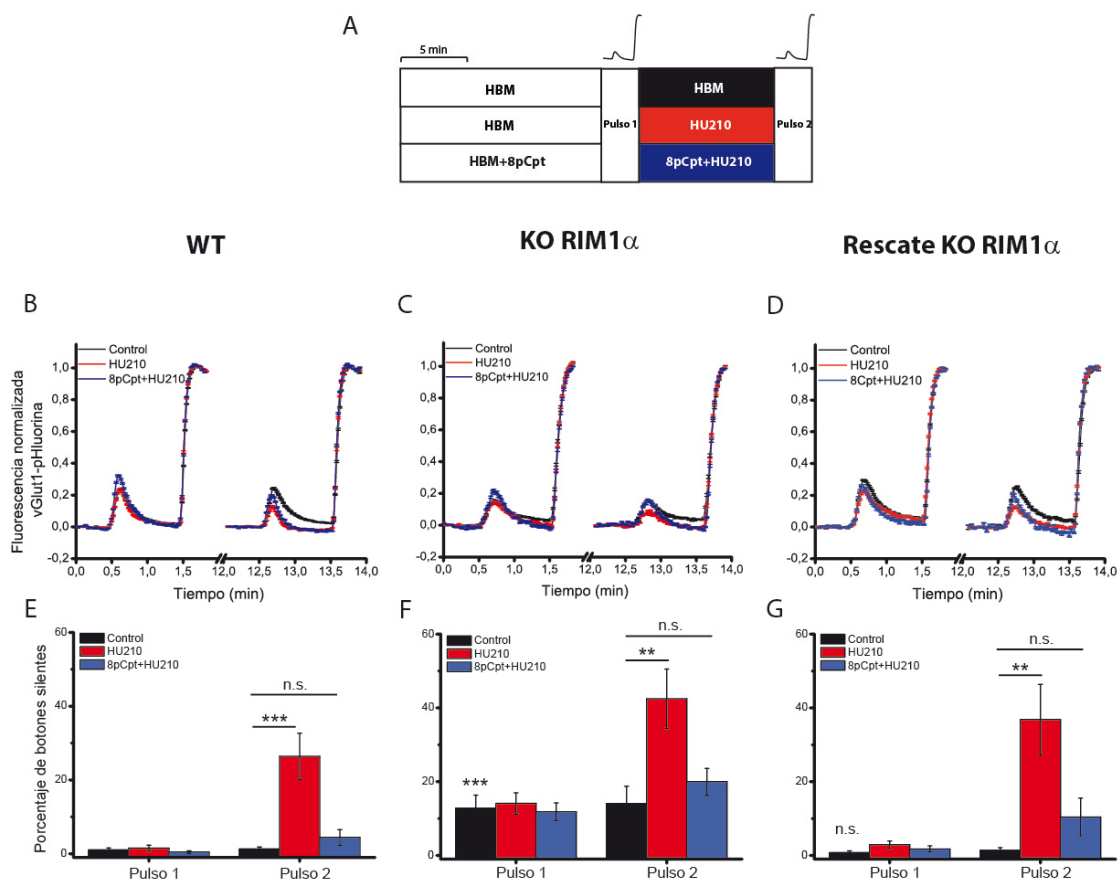
### 13. Papel de RIM1 $\alpha$ en el silenciamiento

La proteína Epac2 interacciona con las proteínas de la zona activa Munc13-1 y RIM1 (Ozaki *et al.*, 2000; Kwan *et al.*, 2007), que son dos elementos clave de la zona activa para la liberación del neurotransmisor. La actividad de Munc13 es esencial para que las vesículas sinápticas adquieran plena competencia exocitótica (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002), ya que promueve la conformación abierta de la proteína syntaxina, lo que permite la formación del complejo SNARE (Ma *et al.*, 2011). Por su parte, las proteínas RIM reclutan canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje a la zona activa presináptica (Kaeser *et al.*, 2011) y activan a Munc13 mediante la disrupción de los homodímeros inactivos de Munc13 (Deng *et al.*, 2011). Además, las proteínas RIM regulan el tamaño del compartimento de vesículas dispuestas para ser liberadas (Dulubova *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2011). De este modo RIM1 $\alpha$  determina la extensión de la zona activa y la probabilidad de liberación, definiendo así la eficacia sináptica (Holderith *et al.*, 2012).

Dado que RIM1 $\alpha$  también determina la probabilidad de liberación en los terminales presinápticos de las células granulares (Kintscher *et al.*, 2013) decidimos estudiar el papel de la isoforma mayoritaria RIM1 $\alpha$  en el silenciamiento presináptico inducido por cannabinoides. Llevamos a cabo experimentos en células granulares que provenían de ratones carentes de RIM1 $\alpha$  que fueron transfectadas con vGlut1-pHluorina (KO RIM1 $\alpha$ ). Otra serie de células transfectadas con vGlut1-pHluorina se transfectaron a su vez con un plásmido que codifica para RIM1 $\alpha$  con el fin de rescatar la función de esta proteína (rescate del KO de RIM1 $\alpha$ ) y los resultados de ambas series se compararon con los ratones de genotipo salvaje (Newton *et al.*, 2006). Realizamos experimentos de doble pulso en los que tras un periodo de atemperado de 15min en medio HBM se aplicó un primer pulso de 50mM KCl (10seg) y se determinó el número de botones silentes. Después de la incubación con HU210 durante 10min, se aplicó un segundo pulso de KCl de 10seg (Figura IV-23A), determinando de nuevo el número de botones silentes. Este protocolo tiene la ventaja de que permite distinguir físicamente los posibles botones sinápticos que son silentes por ausencia de RIM1 $\alpha$  de aquellos botones que son silenciados por los cannabinoides. En las células de ratón de genotipo salvaje, en condiciones control, los dos pulsos de despolarización producen respuestas de fluorescencia promedio de magnitud similar (Figura IV-23B) que se corresponden con la práctica ausencia de botones sinápticos silentes ( $1,1 \pm 0,5\%$  y  $1,3 \pm 0,6\%$  tras el primer y segundo pulso respectivamente, Figura IV-23E). El tratamiento con HU210 inhibe la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio (Figura IV-23B) porque el número de botones sinápticos silentes tras el segundo pulso aumenta significativamente ( $p < 0,001$ ) hasta ( $26,4 \pm 6,3\%$ ) (Figura IV-23E). Sin embargo, la incubación con 8pCpt antes del tratamiento con HU210 (Figura IV-23E) redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el número de botones silentes ( $4,4 \pm 2,1\%$ ). Hay que señalar,

## RESULTADOS

no obstante, que el tratamiento con 8pCpt y HU210, no recuperó completamente la respuesta de exocitosis-endocitosis probablemente debido al hecho de que 8pCpt aumenta la respuesta de exocitosis-endocitosis promedio en el primer pulso (Figura IV-23B).



**Figura IV-23.** Silenciamiento presináptico inducido por HU210 en células granulares de ratón de genotipo salvaje, KO para RIM1α y KO para RIM1α y rescatadas con RIM1α. A) Protocolo experimental. B), C) y D) Respuestas de exocitosis promedio de todos los botones sinápticos normalizada a la respuesta con NH<sub>4</sub>Cl en las distintas condiciones: Control; HU210 (5μM, 10 min) y 8pCpt (50μM, 25min)/HU210. Registros a la izquierda (primer pulso de despolarización); registros a la derecha (segundo pulso de despolarización). Porcentaje de botones silentes en células WT (E), KO para RIM1α (F) y rescatadas con RIM1α (G). En negro se representa el porcentaje de botones silentes condiciones control; en rojo el porcentaje de botones silentes antes y después del tratamiento con HU210 (5μM, 10 min); en azul el porcentaje de botones silentes en células tratadas con 8pCpt (50μM, 25min)/HU210. t de Student, \* p<0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p<0,001. Los datos fueron obtenidos tras analizar el siguiente nº de cubreobjetos (N) y botones sinápticos (n). WT, Control: N=13, n=767; HU210: N=13, n=707; 8pCpt/HU210: N=14, n=745; KO RIM1α, Control: N=11, n=617; HU210: N=10, n=469; 8pCpt/HU210: N=11, n=508; Rescate KO RIM1α Control: N=8, n=445; HU210: N=8, n=420; 8pCpt/HU210: N=9, n=535. \*\*p< 0,01, \*\*\* p<0,001, ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn.

En las células granulares carentes de RIM1α (KO de RIM1α) se observó un nivel de silenciamiento basal mucho más elevado ( $12,9 \pm 3,5\%$ , Figura IV-23F). Sin embargo, la transfección de estas células con la proteína RIM1α, restableció un porcentaje bajo de botones silentes ( $0,7 \pm 0,5\%$ , Figura IV-23G), similar al de las células de genotipo silvestre. El tratamiento con el agonista HU210 (5μM, 10min) aumentó de manera significativa el número de botones silentes en las células KO para la proteína RIM1α, así como en las células KO para la proteína RIM1α rescatadas hasta un  $42,5 \pm 8,0\%$  y

36,8±9,5%, respectivamente (Figura IV-23F, G). Cabe destacar que el HU210 fue capaz de aumentar el número de botones silentes por encima de lo habitual, probablemente debido al alto nivel de silentes basales en el caso del KO RIM1 $\alpha$ . Es probable que en las células de genotipo salvaje los botones silenciados por HU210 sean aquellos que tienen un bajo contenido en RIM1 $\alpha$  y que por tanto tengan una zona activa inestable o poco desarrollada y que la ausencia de RIM1 $\alpha$  podría silenciar parte de estos botones y hacer vulnerables otros que antes no lo eran y que ahora son silenciados por HU210. Además el activador de Epac2 8pCpt fue capaz de prevenir el silenciamiento inducido por HU210 (Figura IV-23E, G), pero no de reducir el elevado número de silentes basales encontrado en las células carentes de la proteína RIM1 $\alpha$  (Figura IV-23F), sugiriendo que Epac2 actúa antes de RIM1 $\alpha$  en la vía de señalización. Por tanto, los botones sinápticos pueden ser silenciados permanentemente como consecuencia de la pérdida de proteínas de la maquinaria de liberación esenciales como la proteína RIM1 $\alpha$  (silenciamiento basal) o transitoriamente por inhibición de la vía de señalización cAMP/Epac2/PLC bajo el control de los receptores CB1 de los cannabinoides.

#### **14. La activación de Epac acerca las vesículas sinápticas a la membrana de la zona activa**

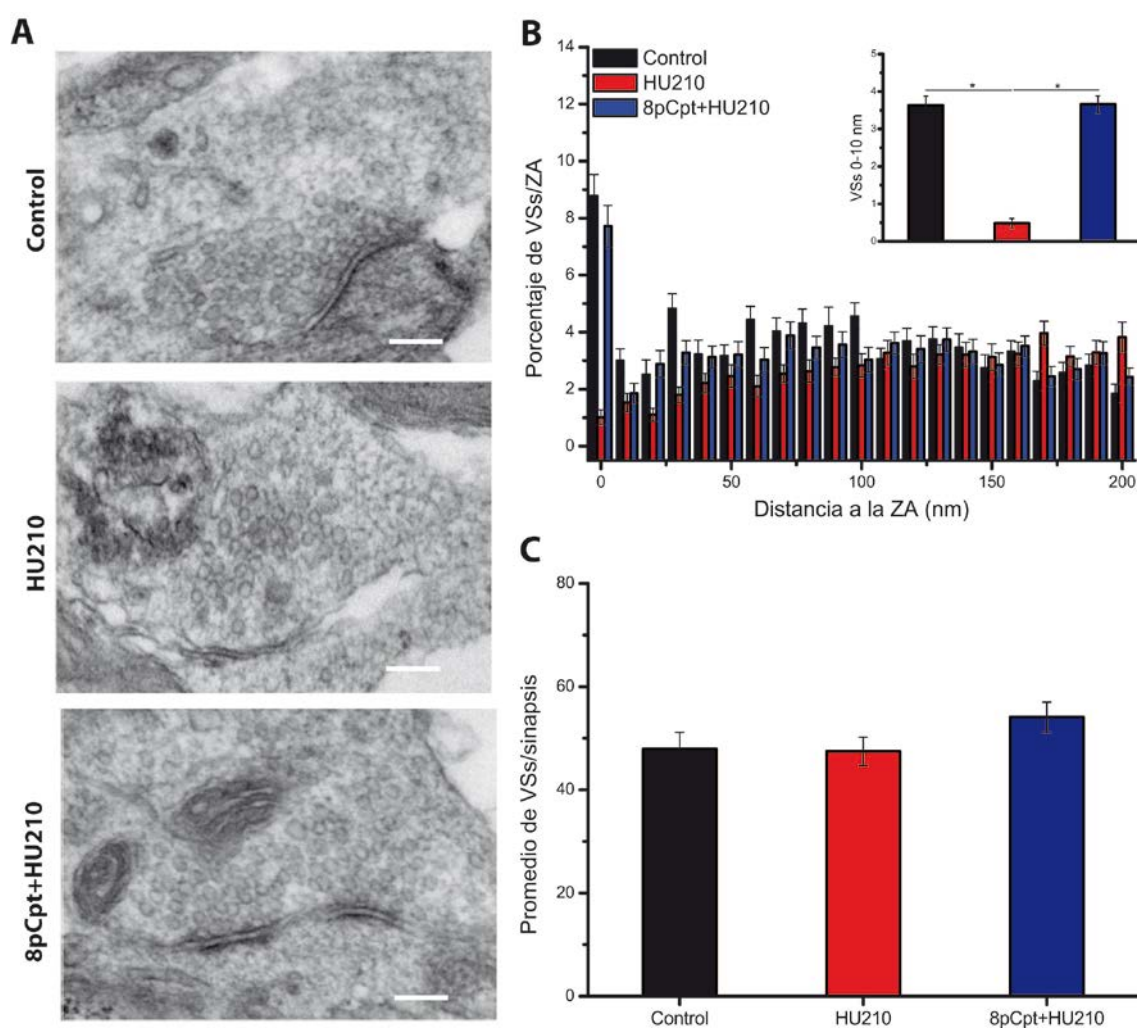
Estudios previos del laboratorio han analizado la distribución de las vesículas sinápticas en los terminales sinápticos de células granulares de cerebelo en cultivo en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 (5 $\mu$ M, 10min). Estos estudios han puesto de manifiesto que el agonista cannabinoide induce un alejamiento de las VSs más cercanas a la membrana (en los primeros 10nm) (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Este alejamiento de las VSs se observó tanto en células granulares, como en sinaptoneurosomas que provenían de ratones de genotipo salvaje, pero no en sinaptosomas de ratones carentes del receptor CB1, indicando la implicación de este receptor en el proceso. Así, este cambio en la posición de las vesículas podría ser el responsable de la ausencia de respuesta exocitótica en los botones silentes.

Dado que las proteínas Epac parecían estar implicadas en el silenciamiento quisimos estudiar si la activación de las mismas era capaz de revertir el efecto de HU210 en la distribución de las VSs en las células granulares de cerebelo. Para ello realizamos experimentos en los que comparamos la distribución de la VSs en células control que permanecían en medio HBM, en células tratadas con HU210 (5 $\mu$ M, 10min) y en células tratadas con 8pCpt (50 $\mu$ M, 15min) y luego con 8pCpt+HU210 durante 10min más (ver protocolo Figura IV-15 de este apartado). Posteriormente, las células se fijaron para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. Se determinaron los porcentajes de VSs en función de su distancia a la membrana en la zona activa, así como el número de VSs en los primeros 10nm y el número total de VSs



## RESULTADOS

por zona activa (Figura IV-24B, *inserto*). El tratamiento con HU210 redujo de manera significativa ( $p < 0,05$ ) el número de VSs situadas en los primeros 10nm de la membrana plasmática de la zona activa, mientras que 8pCpt revirtió este efecto ( $3,6 \pm 0,2$ ;  $0,5 \pm 0,1$  y  $3,7 \pm 0,3$  vesículas sinápticas en células control, tratadas con HU210 y tratadas con 8pCpt/HU210, respectivamente, Figura IV-24). El número total de vesículas no se alteró con los distintos tratamientos. De este modo parece probable que el efecto de reversión del silenciamiento tras el tratamiento con 8pCpt sea debido al acercamiento de las VSs a la zona activa tras la activación de las proteínas Epac.



**Figura IV-24.** 8pCpt revierte el alejamiento de las vesículas sinápticas de la membrana de la zona activa inducido por HU210. A) Imágenes representativas de la distribución de las vesículas sinápticas en condiciones control, tras el tratamiento con HU210 (5 $\mu$ M, 10min) o 8pCpt (50 $\mu$ M, 15min) y HU210 (5 $\mu$ M, 10min). Escala 150nm. B) Cuantificación del porcentaje de vesículas por zona activa en función de la distancia a la membrana plasmática. La figura insertada representa el nº de VSs que se encuentran a menos de 10nm de la membrana. C) Cuantificación del número medio de vesículas por sinapsis en las tres condiciones estudiadas. Los datos fueron obtenidos a partir de n (número de sinapsis analizadas): Control: n=41; HU210: n=41 y 8pCpt/HU210 n=41. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ANOVA con test de Bonferroni.



## **V DISCUSIÓN**



## V DISCUSIÓN

### 1. La activación prolongada del receptor CB1 induce el silenciamiento presináptico

La acción inhibitoria de los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisor se debe a la disminución de la entrada de calcio por la inhibición de los canales dependientes de voltaje y a la reducción de los niveles de AMPc en el compartimento presináptico por la inhibición de las subunidades  $\alpha_i$  de proteínas G sobre la AC (Kreitzer y Regehr, 2001; Brown *et al.*, 2004; Chevaleyre *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos muestran que 10 minutos de tratamiento con el agonista cannabinoide HU210 llevan a una disminución de la descarga de la sonda FM-43 atribuible al silenciamiento de los botones sinápticos ya que el déficit de descarga tras el tratamiento con los cannabinoides persiste con estimulaciones prolongadas que deberían revertir la inhibición mediada por reducción de la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos planteamos también si una activación más corta del receptor (40 segundos) podía inducir el silenciamiento presináptico. Además, los experimentos se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de calcio, para corroborar que el posible silenciamiento persistía a altas concentraciones de calcio extracelulares. Los resultados muestran que el tratamiento corto (40 segundos) con cannabinoides no indujo silenciamiento que pudiéramos asociar específicamente a la activación de estos receptores. De hecho tampoco se observó una inhibición clara de la exocitosis, que fuese revertida por una estimulación más intensa, lo que denotaría la presencia de un componente de liberación por cannabinoides debido a una reducción de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante experimentos con vGlut1-pHluorina que confirman que la inducción del silenciamiento requiere tiempos de activación del receptor CB1 de cannabinoides prolongados y es independiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Ramírez-Franco *et al.*, 2014).

No obstante, sí se observó un silenciamiento que fue inversamente proporcional a la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto, dependiente más de la eficiencia de la estimulación a la hora de inducir la liberación de neurotransmisor, que del tratamiento con cannabinoides. En este sentido, cuanto menor es la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor es el número de botones silentes aunque este silenciamiento parece independiente de la presencia del agonista cannabinoide. Este dato subraya la necesidad de estimulaciones intensas para poder distinguir los botones sinápticos que son verdaderamente silentes de aquellos que presentan una baja probabilidad de liberación (Cousin y Evans, 2011).

En esta Tesis Doctoral hemos encontrado que el silenciamiento presináptico se asocia a una disminución de los niveles de AMPc que afecta a la maquinaria exocitótica por depresión de una vía de señalización AMPc/Epac/PLC/RIM iniciada por el receptor CB1 y que termina afectando a la distribución de las vesículas sinápticas en las proximidades de la membrana presináptica en la zona activa. El silenciamiento inducido por los cannabinoides se asocia a una disminución de los niveles de AMPc por debajo de los niveles basales, de ahí el requerimiento de un tratamiento con el agonista cannabinoide suficiente para producir una inhibición prolongada de la adenilato ciclasa y así lograr una disminución neta de los niveles de AMPc por acción de las fosfodiesterasas de este nucleótido.

## 2. Marcadores presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento

Las acciones a largo plazo de los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisor afectan en última instancia a la maquinaria exocitótica (Schoch *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2012). Hemos evaluado la posible relevancia de algunas proteínas presinápticas que son fundamentales en el mecanismo de liberación de neurotransmisores, como marcadores de susceptibilidad al silenciamiento por cannabinoides. Para ello realizamos experimentos funcionales con la sonda FM1-43 para identificar los botones silenciados por el tratamiento con HU210 seguidos de experimentos de inmunocitoquímica *post-hoc* (Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Ramirez-Franco *et al.*, 2013), para determinar de manera semi-cuantitativa los niveles de inmunorreactividad de estas proteínas. Se analizaron las proteínas de la maquinaria exocitótica RIM1 $\alpha$  y Munc13-1 que tienen un papel central en la liberación de neurotransmisor. Las proteínas RIM organizan la zona activa ya que interaccionan directa o indirectamente con el resto de las proteínas de la zona activa (Sudhof 2012), reclutan canales de Ca<sup>2+</sup> en los sitios de liberación (Kaesler *et al.*, 2011) e inducen la formación de un heterómero activo con Munc13 (Deng *et al.*, 2011). Por su parte, las proteínas Munc13 son esenciales para la preparación de las vesículas para la exocitosis, lo que se conoce como el proceso de *priming* de las vesículas (Augustin *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2002), ya que promueven la conformación abierta de la proteína syntaxina permitiendo el inicio de la formación del complejo SNARE (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2013). Analizamos también por inmunocitoquímica el contenido en el receptor CB1 de los botones sinápticos con el fin de relacionar el silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides con el grado de expresión del propio receptor CB1.

Los resultados muestran que existe una correlación positiva entre el grado de descarga de la sonda FM1-43 y el contenido de la proteína RIM1 $\alpha$  y que esta correlación es mucho más fuerte cuando se considera la relación o cociente entre el

contenido en receptor CB1 y el contenido en proteína RIM1 $\alpha$  de los botones sinápticos. De manera que los botones sinápticos con un menor contenido de la proteína RIM1 $\alpha$  y un mayor contenido en el receptor CB1 parecen ser más susceptibles a ser silenciados. Si tenemos en cuenta las funciones fundamentales RIM1 $\alpha$  en relación de la liberación de neurotransmisores como la de reclutar canales de Ca<sup>2+</sup> en la zona activa o la de promover un heterodímero activo con Munc13 o la formación del complejo tripartito con Munc13-1 y Rab3A para permitir el acercamiento de las vesículas a la membrana, denominado proceso de *docking*, cabría pensar que los botones sinápticos con un bajo contenido en RIM1 $\alpha$  podrían tener menos vesículas dispuestas en la proximidades de la membrana y una menor probabilidad de liberación.

No obstante resultó un tanto sorprendente la ausencia total de correlación entre el grado de descarga de la sonda FM1-43 y el grado de expresión de la proteína Munc13-1 dado su papel esencial en la preparación de las vesículas sinápticas para la fusión (Augustin *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2002). La actividad de esta proteína está modulada por su interacción con DAG (Rhee *et al.*, 2002), así como por calcio (Shin *et al.*, 2010) y calmodulina (Junge *et al.*, 2004). El DAG promueve la translocación de Munc13-1 del citosol a la membrana (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002) lo que permite su interacción con RIM1 $\alpha$  y la formación del heterodímero activo para la acción de *priming* (Kaeser *et al.*, 2011). De este modo es posible que los niveles totales de Munc13, que son los reconocidos por el anticuerpo, no se correlacionen con el grado de descarga de la sonda FM1-43, mientras que es probable que la fracción de Munc13-1 asociada a la membrana y a la proteína RIM1 $\alpha$  sea más relevante a la hora de señalar el grado de descarga y por tanto la susceptibilidad al silenciamiento por cannabinoides.

Por tanto, estos datos parecen indicar que el contenido en la proteína RIM1 $\alpha$  es un buen determinante de la capacidad de exocitosis de los botones sinápticos (Ramirez-Franco *et al.*, 2014) y que un alto contenido en el receptor CB1 así como un bajo contenido en la proteína RIM1 $\alpha$  podrían constituir la etiqueta molecular de los botones sinápticos susceptibles de ser silenciados por los cannabinoides.

### 3. Transitoriedad del silenciamiento y relevancia fisiológica

La activación del receptor CB1 inhibe la liberación de neurotransmisor tanto a corto, como a largo plazo. Los efectos a corto plazo (STD, del inglés *Short-Term Depression*) están relacionados con la inhibición de la entrada de calcio por los canales de calcio dependientes de voltaje, así como con activación de la salida de potasio por apertura de los canales rectificadores de potasio (Mackie *et al.*, 1995; Guo y Ikeda

2004). Por otro lado, en la depresión a largo a plazo (LTD, del inglés *Long Term Depression*) parece estar implicada la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y la disminución de los niveles de AMP cíclico (Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009). La reducción en los niveles de este mensajero se ha asociado a cambios persistentes sobre la maquinaria exocitótica (Schoch *et al.*, 2002; Azad *et al.*, 2004; Heifets y Castillo 2009; Tsetsenis *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2012). Además la inducción de la LTD requiere tiempos de activación del receptor CB1 mucho mayores que los requeridos en la inducción de los fenómenos de STD (Chevalleyre y Castillo, 2003; Ronesi *et al.*, 2004).

Los cannabinoides están implicados en la LTD de las sinapsis que se establecen entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (Kreitzer y Regehr 2001; Safo y Regehr 2005; Carey *et al.*, 2011). En estas sinapsis la activación de los receptores CB1 induce el fenómeno de la LTD pero no es suficiente para su mantenimiento que parece necesitar un componente postsináptico. Es probable que la activación prolongada del receptor CB1 en la fase de inducción sea capaz de inducir el silenciamiento de algunas fibras paralelas, aunque en los experimentos de electrofisiología es difícil distinguir el fenómeno a nivel de botones sinápticos individuales ya que las respuestas postsinápticas reflejan normalmente la respuesta de muchas aferentes. Los agonistas cannabinoides deprimen la transmisión sináptica de las fibras paralelas sobre las células de Purkinje (Safo y Regehr 2005). Dada la baja probabilidad de liberación de las fibras paralelas in vivo (Dittman *et al.*, 2000) es probable que la inducción de LTD en estas sinapsis conlleve el silenciamiento de algunos botones sinápticos tras la adición de los cannabinoides.

Una característica del silenciamiento inducido por cannabinoides que hace posible su participación en la fase de inducción de la LTD en las sinapsis entre las células granulares y las células de Purkinje es la transitoriedad del mismo. Para distinguir si el silenciamiento era un fenómeno irreversible o podía ser revertido tras la retirada del agonista realizamos experimentos en los observamos que el silenciamiento inducido por los cannabinoides se revertía de forma espontánea 20 minutos después del lavado del agonista. El tiempo requerido para reversión fue independiente del número de botones silentes. Cabe mencionar, que aunque el silenciamiento inducido por los cannabinoides comparta características con los botones silenciados tras una despolarización prolongada (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2011), hay que señalar que es este último caso el fenómeno de silenciamiento es irreversible y supone una eliminación definitiva de sinapsis funcionales. Por tanto, nuestros datos sugieren que el silenciamiento inducido por los cannabinoides es un fenómeno reversible, independientemente del grado de silenciamiento que se induce y que los botones silenciados después de un tiempo se convierten en botones sinápticos activos. Por lo tanto, el silenciamiento es un proceso



de plasticidad dinámico, ya que puede ser modulado de manera bidireccional en periodos de tiempo relativamente cortos.

Otra característica del silenciamiento inducido por cannabinoides que subraya una posible relevancia fisiológica del fenómeno es que no solamente se observa tras la estimulación farmacológica de los receptores CB1, sino también con el agonista endógeno 2-araquidonilglicerol (2-AG). No obstante, la sólo adición de 2-AG aunque indujo una disminución de la respuesta excitotónica global, no incrementó de manera significativa el porcentaje de botones silentes probablemente debido al hecho que los cannabinoides endógenos, a diferencia de los sintéticos, son susceptibles de ser degradados. Ahora bien, cuando combinamos el tratamiento de 2-AG con un inhibidor de la monoacilglicerol lipasa, MGL, enzima que degrada este endocannabinoide in vivo (Dinh *et al.*, 2002; Dinh *et al.*, 2004; Vandevorde y Lambert 2007), observamos que el agonista endógeno 2-AG llevaba a un aumento significativo del número de botones silentes.

Probablemente el fenómeno de LTD asociado a las sinapsis entre las células granulares de cerebelo y las células de Purkinje esté relacionado con el control de la actividad motora. La plasticidad de la transmisión sináptica de las fibras paralelas en la capa molecular del cerebelo regula el aprendizaje del movimiento y los fallos en la transmisión de estas sinapsis tiene efectos drásticos en los paradigmas de aprendizaje motor (Evans 2007). Además los registros en rodajas de cerebelo de ratas adultas sugieren que la gran mayoría (alrededor de un 80%) de las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje son silentes (Isope y Barbour 2002) y las predicciones teóricas de remodelación de la corteza cerebelar indican la necesidad de la activación de sinapsis silentes en el aprendizaje motor (Porrill y Dean 2008). Así, el silenciamiento y la activación de botones silenciados previamente podría ser un proceso importante en el aprendizaje motor.

#### **4. Silenciamiento y AMPc**

El AMPc es importante para el mantenimiento de la actividad presináptica dado que el aumento en los niveles de este mensajero potencia la liberación del neurotransmisor en diferentes sinapsis (Weisskopf *et al.*, 1994; Herrero y Sanchez-Prieto 1996; Huang y Hsu 2006) así como el número de sitios de liberación funcionales (Bolshakov *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1999). Las acciones a largo plazo de la activación del receptor de cannabinoides de tipo 1 de depresión prolongada de la transmisión sináptica (LTD) también se han relacionado con la inhibición de la adenilato ciclasa y con cambios en los niveles de AMPc (Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo 2009). El aumento de los niveles de AMPc aumenta el

número de sitios de liberación funcionales (Bolshakov *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1999) lo que sugiere su implicación en la reactivación de botones sinápticos silentes. En este mismo contexto, trabajos previos han relacionado el silenciamiento presináptico con una disminución en los niveles de este segundo mensajero. Así, el aumento de los niveles de AMPc con forskolina previene la inducción del silenciamiento mediante una despolarización crónica (Moulder *et al.*, 2008), la activación prolongada del receptor CB1 de cannabinoides (Ramirez-Franco *et al.*, 2014) o durante el desarrollo (Yao *et al.*, 2006). Por esa razón nos planteamos si una reducción en los niveles de este mensajero era la responsable del silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides. Nuestros datos muestran que la inhibición de la AC con SQ22536 en el cultivo primario de neuronas granulares redujo los niveles basales de AMPc y esto se relaciona con un aumento en el número de botones sinápticos silentes. La inhibición de la adenilato ciclasa con SQ2236 ocluyó la acción del agonista cannabinoide para inducir el silenciamiento, aunque en esta misma condición se observó una disminución mayor en los niveles de AMPc lo que sugiere que no toda la actividad de la AC está bajo el control del receptor CB1.

## 5. Implicación de la proteína Epac2 en el silenciamiento

La falta de capacidad para liberar el neurotransmisor en los botones silentes podría estar determinada por defectos de la maquinaria exocitótica. El fenómeno del silenciamiento presináptico ha sido relacionado con la disminución en los niveles de varias proteínas presinápticas de la zona activa como RIM y Munc13 (Jiang *et al.*, 2010; Lazarevic *et al.*, 2011), así como con una disminución del grupo de vesículas listas para ser liberadas (Moulder *et al.*, 2004; Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Además los botones sinápticos con un contenido bajo en RIM1 $\alpha$  son más susceptibles a ser silenciados tras la activación del receptor de cannabinoides de tipo 1 (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Sin embargo, la cascada de señalización que relaciona la disminución de los niveles de AMPc con las alteraciones de la maquinaria exocitótica para impedir la liberación de neurotransmisor no está del todo esclarecida.

Las proteínas Epac están implicadas en la potenciación de la exocitosis en distintos tipos de células y tejidos no neurales como células secretoras de insulina (Kwan *et al.*, 2007), melanocitos de la pituitaria (Sedj *et al.*, 2005) y la reacción acrosómica de los espermatozoides (Branham *et al.*, 2009). Las proteínas Epac también se han relacionado con la potenciación de la transmisión sináptica en el sistema nervioso central. Así, las proteínas Epac juegan un papel crucial como efectores del AMPc en la potenciación de la transmisión sináptica (Kaneko y Takahashi 2004; Gekel y Neher 2008), en el reclutamiento de las vesículas sinápticas a la zona activa (Sakaba y Neher 2003), en la liberación espontánea e inducida (Yang *et al.*, 2012). Del mismo

modo están implicadas en procesos presinápticos de plasticidad (Fernandes *et al.*, 2015), en la potenciación de la liberación de glutamato dependiente del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Ferrero *et al.*, 2013) y en el aprendizaje espacial (Yang *et al.*, 2012).

Trabajos previos del laboratorio en células granulares de cerebelo han demostrado que el activador de la adenilato ciclasa forskolina previene por completo la inducción del silenciamiento por HU210 y que este efecto se mantenía incluso en presencia del inhibidor de proteína quinasas H89, lo que sugiere la participación de un mecanismo independiente de la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA (Ramírez-Franco *et al.*, 2014). Además, también se ha descrito que el activador específico de la PKA, 6-benzoil-cAMP, no es capaz de revertir la inducción del silenciamiento, indicando un papel limitado de esta quinasa en el proceso (Ramírez-Franco *et al.*, 2014). Así nos planteamos profundizar en el mecanismo por el que Epac actúa sobre la maquinaria exocitótica.

Los experimentos con siARN para reducir la expresión de Epac2 en las células granulares de cerebelo mostraron la incapacidad del activador de Epac 8pCpt para revertir el silenciamiento inducido por HU210. Sin embargo, el tratamiento con siARN no indujo por sí mismo el silenciamiento de los botones sinápticos probablemente por la actividad remanente de Epac que es un 26,7% del control. Esta resistencia al silenciamiento incluso con bajos niveles de Epac se relaciona con la fuerte reducción de los niveles de AMPc que se requiere para inducir dicho silenciamiento. Por ello, recurrimos a la inhibición farmacológica de Epac y encontramos que el inhibidor específico de Epac2 ESI05 no sólo anuló la capacidad de 8pCpt de prevenir el silenciamiento inducido por el agonista cannabinoide sino que también aumentó el número de botones silentes. Además la inhibición farmacológica de la proteína Epac2 también anuló la capacidad de 8pCpt de acelerar la activación de botones sinápticos previamente silenciados por los cannabinoides. Por lo contrario, la disminución de la expresión de Epac1 no afectó la capacidad de 8pCpt de prevenir el silenciamiento, lo que descarta la implicación de esta isoforma Epac1. Estos datos sugieren que la disminución en los niveles de AMPc observados como causa del silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides se traduce a su vez en una fuerte reducción de la actividad de Epac2 que debe afectar a la maquinaria exocitótica.

## 6. Implicación de la PLC en el silenciamiento presináptico

La inhibición de Epac2 aumenta el número de botones silentes, mientras que su activación acelera el despertar de botones previamente silenciados por la estimulación del receptor CB1. Esto sugiere que la señalización dependiente de AMPc mediada por Epac2 determina el estado activo/silente de los botones sinápticos en nuestro modelo

de estudio. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de señalización de las proteínas Epac2 en la presinapsis en relación con la transmisión sináptica.

Nuestros resultados muestran un nexo entre la actividad de las proteínas Epac y la proteína que hidroliza  $\text{PIP}_2$ , PLC. Así hemos observado que el inhibidor de PLC U73122 aumentó el número de botones silentes y anuló la capacidad del activador de Epac 8pCpt de prevenir el silenciamiento. Del mismo modo el inhibidor de PLC afectó a la capacidad de 8pCpt de acelerar la activación de botones previamente silenciados por HU210, lo que sugiere la implicación de esta proteína en la vía de señalización del AMPc en alguna etapa posterior a Epac2. La relación entre Epac y PLC se ha demostrado en células secretoras  $\beta$ -pancreáticas (Kwan *et al.*, 2007; Dzhura *et al.*, 2011), en la exocitosis de los espermatozoides (Branham *et al.*, 2009; Lucchesi *et al.*, 2016) y en sinaptosomas de corteza cerebral (Ferrero *et al.*, 2013). La relación entre Epac y PLC parece radicar en el hecho de que la actividad de intercambio de guanina de las proteínas Epac activa proteínas G monoméricas de la superfamilia de proteínas Ras como Rap1 y Rap2 (Kawasaki *et al.*, 1998) que se unen y activan a la PLC $\epsilon$  (Schmidt *et al.*, 2001). En sistemas secretores no neuronales la actividad de PLC $\epsilon$  es necesaria para la secreción de insulina (Dzhura *et al.*, 2011). En sinaptosomas de corteza de cerebro la potenciación de la liberación inducida por la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos también requiere de la actividad de PLC ya que esta potenciación se anula con el inhibidor de esta enzima (Ferrero *et al.*, 2013) lo que sugiere que el aumento de AMPc proporcionado por el receptor  $\beta$ -adrenérgico activaría la proteína Epac que a su vez activaría PLC promoviendo la hidrólisis de fosfoinosítidos. Esto resultaría en la producción de DAG que su vez activaría/translocaría Munc13-1 a la membrana de la zona activa. Además, tanto la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico con el agonista isoproterenol como la activación de Epac con 8pCpt incrementan la acumulación de IP1 derivado del IP3 generado por la actividad de PLC (Ferrero *et al.*, 2013). Finalmente, la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico potencia la interacción entre Rab3A y RIM1 $\alpha$  (Ferrero *et al.*, 2013). La relación de la proteína Epac2 con la maquinaria exocitótica se ha demostrado también por su interacción con la proteína de la zona activa RIM1 $\alpha$  (Ozaki *et al.*, 2000; Branham *et al.*, 2009) y por el hecho de que los ratones carentes de Epac2 muestran niveles reducidos de algunas proteínas presinápticas como la proteína de andamiaje CASK, la proteína de membrana de las vesículas sinápticas sinaptoporina y la proteína asociada a vesículas Rab3A (Fernandes *et al.*, 2015).

Por tanto, la relación funcional entre las actividades de Epac y PLC sugiere una posible explicación de cómo esta vía de señalización podría interferir con la maquinaria exocitótica para silenciar los botones sinápticos. Así, la generación de DAG activaría la proteína Munc13 translocándola a la membrana lo que a su vez promovería el anclaje de las vesículas sinápticas en las proximidades de la zona activa por medio de la formación del complejo tripartito Munc13/RIM1/Rab3 (Dulubova *et al.*, 2005). La

activación de Munc13 por el DAG promovería su actividad para habilitar a las vesículas sinápticas la para fusión, lo que se conoce como actividad de *priming*, que requiere la presencia de las proteínas RIM (Gracheva *et al.*, 2008; Kaeser *et al.*, 2011), y que parece radicar en la adopción de una conformación abierta de la proteína syntaxina-1 (Richmond *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2013) para promover la formación del complejo SNARE entre syntaxina-1, SNAP-25 y sinaptobrevina.

Se podría pensar que la inducción de silenciamiento sináptico tras la activación prolongada del receptor de cannabinoides de tipo 1 es una consecuencia de la disminución de los niveles de AMPc y de la actividad de Epac2 que da lugar a una menor actividad de PLC y producción de DAG lo que resultaría en una menor translocación de Munc13 a la membrana. La falta de Munc13 en membrana limitaría la interacción de Munc13-1 para formar el complejo trimérico Munc13/RIM1/Rab3, disminuyendo así tanto el anclaje como la maduración de las vesículas sinápticas (Betz *et al.*, 2001; Dulubova *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011). Esto además está de acuerdo con lo observado en los experimentos de microscopía electrónica donde se ha encontrado una disminución en el número de vesículas cercanas a membrana de la zona activa tras la activación prolongada del receptor CB1 de cannabinoides (Ramirez-Franco *et al.*, 2014).

## 7. RIM1 $\alpha$ como diana de la maquinaria exocitótica del silenciamiento

Dado que RIM1 $\alpha$  influye en la probabilidad de liberación de neurotransmisor en los terminales presinápticos de las células granulares (Kintscher *et al.*, 2013) decidimos estudiar el papel de la isoforma mayoritaria RIM1 $\alpha$  en el silenciamiento presináptico inducido por cannabinoides en ratones de genotipo silvestre y en ratones carentes de esta proteína. Los resultados mostraron que las células granulares de cerebelo de ratones de genotipo salvaje prácticamente no tienen botones silentes, mientras que las mismas células obtenidas a partir de ratones carentes de RIM1 $\alpha$  tienen un nivel basal de botones silentes más elevado. Sin embargo, el recate de la función de RIM1 $\alpha$  en las células carentes de esta proteína fue capaz de revertir el silenciamiento basal observado en los botones sináptico de ratones RIM1 $\alpha$  KO. Estos datos están de acuerdo con el papel esencial de las proteínas RIM en la liberación de neurotransmisor (Koushika *et al.*, 2001; Schoch *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2008; Kintscher *et al.*, 2013).

Las proteínas RIM son proteínas multidominio que juegan un papel central en la organización de la zona activa (Mittelstaedt *et al.*, 2010). RIM1 $\alpha$  y RIM2 $\alpha$  contienen todos los dominios RIM incluidos los dominios de unión a Rab3 y Munc13-1 (Schoch *et al.*, 2006). A pesar de que RIM2 $\alpha$  se expresa conjuntamente con RIM1 $\alpha$  en varios tipos

celulares incluidas las células granulares de cerebelo (Schoch *et al.*, 2006), RIM2 $\alpha$  no compensa la falta de RIM1 $\alpha$  en estas células. Así, la falta de RIM1 $\alpha$  afecta a la liberación de neurotransmisor (Schoch *et al.*, 2002; Calakos *et al.*, 2004), la probabilidad de liberación de neurotransmisor, la plasticidad a corto plazo y el tamaño del pool de vesículas listas para ser liberadas (Schoch *et al.*, 2002; Calakos *et al.*, 2004). Las isoformas largas de RIM ayudan a la maduración de las vesículas sinápticas mediante el reclutamiento y la estabilización de las proteínas Munc13 a la membrana de la zona activa (Betz *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2011). Por tanto es posible que la falta de RIM1 $\alpha$  reduzca el número de sitios de liberación. Las proteínas RIM además localizan los canales de Ca<sup>2+</sup> en la zona activa (Kaeser *et al.*, 2011) y la falta de RIM1 $\alpha$  también causa una entrada menor de Ca<sup>2+</sup> en células granulares de cerebelo (Kintscher *et al.*, 2013). Además los botones sinápticos con un contenido bajo en RIM1 $\alpha$  son más susceptibles a ser silenciados tras la activación del receptor de cannabinoides de tipo 1 (Ramirez-Franco *et al.*, 2014).

Además hemos encontrado que en las células granulares de cerebelo carentes de RIM1 $\alpha$  la activación prolongada del receptor CB1 todavía es capaz de inducir más silenciamiento a pesar de los altos niveles de silenciamiento basal. Parece pues probable no sólo que RIM2 $\alpha$  no sustituye completamente la función de RIM1 $\alpha$ , como demuestra la existencia de botones silentes basales en las células procedentes de los ratones carentes de esta última proteína, sino que también muchos botones sinápticos de estas células tienen una maquinaria exocitótica debilitada susceptible de ser silenciada por el tratamiento con los cannabinoides. Es probable que algunos botones sinápticos de las células carentes de RIM1 $\alpha$  muestren defectos en la maquinaria exocitótica como consecuencia de una entrada reducida de la entrada de calcio, de la reducción del pool de vesículas listas para ser liberadas y del desacoplamiento entre la entrada de calcio y la exocitosis provocado por el aumento de la distancia entre la fuente de calcio y el sensor del mismo.

Otro resultado de interés es que los botones sinápticos silentes como consecuencia de la carencia RIM1 $\alpha$  son insensibles a la activación de la proteína Epac por 8pCpt lo que sugiere que esta proteína se sitúa en alguna etapa anterior de las proteínas RIM en la cascada de señalización. Sin embargo, el silenciamiento inducido por la activación prolongada de los receptores de cannabinoides sí que es prevenido completamente por la activación de Epac. Por tanto nuestros muestran que los botones sinápticos de la células granulares pueden ser silenciados de forma permanente por una pérdida de proteínas esenciales para la maquinaria de liberación como RIM1 $\alpha$  (silentes basales) o de manera transitoria por la regulación a la baja de la vía AMPc/Epac2/PLC causada por una activación sostenida del receptor CB1.

## 8. Redistribución de las vesículas sinápticas

Estudios previos de nuestro grupo han analizado la distribución de las vesículas sinápticas en los terminales sinápticos de cultivos de células granulares de cerebelo en condiciones control y tras el tratamiento con HU210 durante 10 minutos, encontrando que los cannabinoides inducen la retirada (primeros 10nm) de las vesículas sinápticas de las proximidades de la membrana en la zona activa (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). De manera que este desacoplamiento de la exocitosis por retirada de las vesículas sinápticas podría explicar por sí mismo el silenciamiento presináptico, ya que incluso una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  normal en el botón sináptico fallaría a la hora de producir la exocitosis.

En el presente estudio también analizamos la distribución de las vesículas sinápticas para determinar si la prevención del silenciamiento inducido por los cannabinoides que se observa tras la activación de las proteínas Epac con 8pCpt se correlaciona con los efectos en la distribución de vesículas. Los resultados indican que mientras que el número de VSs localizadas a menos de 10nm de la membrana plasmática en la zona activa disminuyó significativamente tras el tratamiento con HU210, este efecto fue revertido tras el tratamiento con 8pCpt. Por tanto, parece probable que la causa final del silenciamiento es la retirada de las VSs de la membrana y el fallo de la exocitosis tras la despolarización de los terminales sinápticos. Además nuestros resultados prueban que los receptores acoplados a proteínas G pueden modular la probabilidad de liberación cambiando la distribución de las vesículas sinápticas y que esta acción está mediada por cambios en los niveles de AMPc.







## **VI CONCLUSIONES**



## VI CONCLUSIONES

1. El silenciamiento presináptico requiere la activación prolongada del receptor CB1 mediante agonistas exógenos o endógenos
2. El silenciamiento inducido por los agonistas cannabinoides es un proceso reversible, que puede ser modulado bidireccionalmente por lo que podría tener relevancia fisiológica
3. La disminución de los niveles de AMPc aumenta el porcentaje de botones silentes y ocluye el silenciamiento inducido por HU210
4. Los inhibidores de la proteína Epac2 y de la fosfolipasa C aumentan el porcentaje de botones silentes y anulan la capacidad de 8pCpt de prevenir y revertir el silenciamiento
5. La proteína presináptica RIM1 $\alpha$  parece clave en el proceso del silenciamiento, ya que su ausencia aumenta significativamente el número de botones silentes
6. El silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides es el resultado de una señalización disminuida de la vía AC/AMPc/Epac2/PLC que causa el alejamiento de las vesículas sinápticas de la membrana plasmática de la zona activa





## **VII BIBLIOGRAFÍA**





## VII BIBLIOGRAFÍA

**Ackermann, F., C. L. Waites y C. C. Garner** (2015). *Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates*. EMBO Rep **16**(8): 923-938.

**Adermark, L. y D. M. Lovinger** (2007). *Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step*. Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20564-20569.

**Aiba, A., C. Chen, K. Herrup, C. Rosenmund, C. F. Stevens y S. Tonegawa** (1994). *Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice*. Cell **79**(2): 365-375.

**Aihara, Y., H. Mashima, H. Onda, S. Hisano, H. Kasuya, T. Hori, S. Yamada, H. Tomura, Y. Yamada, I. Inoue, I. Kojima y J. Takeda** (2000). *Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter*. J Neurochem **74**(6): 2622-2625.

**Alabi, A. A. y R. W. Tsien** (2013). *Perspectives on Kiss-and-Run: Role in Exocytosis, Endocytosis, and Neurotransmission*. Annu Rev Physiol **75**: 393-422.

**Alger, B. E.** (2012). *Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know*. J Physiol **590**(10): 2203-2212.

**Altrock, W. D., S. tom Dieck, M. Sokolov, A. C. Meyer, A. Sigler, C. Brakebusch, R. Fassler, K. Richter, T. M. Boeckers, H. Potschka, C. Brandt, W. Loscher, D. Grimberg, T. Dresbach, A. Hempelmann, H. Hassan, D. Balschun, J. U. Frey, J. H. Brandstatter, C. C. Garner, C. Rosenmund y E. D. Gundelfinger** (2003). *Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon*. Neuron **37**(5): 787-800.

**Alvarez de Toledo, G., R. Fernandez-Chacon y J. M. Fernandez** (1993). *Release of secretory products during transient vesicle fusion*. Nature **363**(6429): 554-558.

**Aravanis, A. M., J. L. Pyle y R. W. Tsien** (2003). *Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity*. Nature **423**(6940): 643-647.

**Augustin, I., C. Rosenmund, T. C. Sudhof y N. Brose** (1999). *Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles*. Nature **400**(6743): 457-461.

**Azad, S. C., K. Monory, G. Marsicano, B. F. Cravatt, B. Lutz, W. Zieglgansberger y G. Rammes** (2004). *Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling*. J Neurosci **24**(44): 9953-9961.

**Balaji, J. y T. A. Ryan** (2007). *Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode*. Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20576-20581.

**Bartolome-Martin, D., J. Ramirez-Franco, E. Castro, J. Sanchez-Prieto y M. Torres** (2012). *Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages*. J Cell Sci **125**(Pt 2): 422-434.

**Beck, K. A. y J. H. Keen** (1991). *Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2*. J Biol Chem **266**(7): 4442-4447.

**Bender, V. A., K. J. Bender, D. J. Brasier y D. E. Feldman** (2006). *Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex*. J Neurosci **26**(16): 4166-4177.

**Bergsman, J. B., S. R. Krueger y R. M. Fitzsimonds** (2006). *Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta*. J Neurosci Methods **152**(1-2): 32-39.

**Betz, A., U. Ashery, M. Rickmann, I. Augustin, E. Neher, T. C. Sudhof, J. Rettig y N. Brose** (1998). *Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release*. Neuron **21**(1): 123-136.

**Betz, A., P. Thakur, H. J. Junge, U. Ashery, J. S. Rhee, V. Scheuss, C. Rosenmund, J. Rettig y N. Brose** (2001). *Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming*. Neuron **30**(1): 183-196.

**Blakely, R. D. y R. H. Edwards** (2012). *Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters*. Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2): a005595.

**Bolshakov, V. Y., H. Golan, E. R. Kandel y S. A. Siegelbaum** (1997). *Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus*. Neuron **19**(3): 635-651.

**Bonifacino, J. S. y L. M. Traub** (2003). *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem **72**: 395-447.

**Borland, G., M. Gupta, M. M. Magiera, C. J. Rundell, S. Fuld y S. J. Yarwood** (2006). *Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting*. Mol Pharmacol **69**(1): 374-384.

**Bos, J. L.** (2006). *Epac proteins: multi-purpose cAMP targets*. Trends Biochem Sci **31**(12): 680-686.

**Brandon, E. P., M. Zhuo, Y. Y. Huang, M. Qi, K. A. Gerhold, K. A. Burton, E. R. Kandel, G. S. McKnight y R. L. Idzerda** (1995). *Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8851-8855.

- Branham, M. T., M. A. Bustos, G. A. De Blas, H. Rehmann, V. E. Zarelli, C. L. Trevino, A. Darszon, L. S. Mayorga y C. N. Tomes** (2009). *Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis*. J Biol Chem **284**(37): 24825-24839.
- Breckler, M., M. Berthouze, A. C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel y F. Lezoualc'h** (2011). *Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications*. Cell Signal **23**(8): 1257-1266.
- Brenowitz, S. D., A. R. Best y W. G. Regehr** (2006). *Sustained elevation of dendritic calcium evokes widespread endocannabinoid release and suppression of synapses onto cerebellar Purkinje cells*. J Neurosci **26**(25): 6841-6850.
- Brenowitz, S. D. y W. G. Regehr** (2003). *Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells*. J Neurosci **23**(15): 6373-6384.
- Brenowitz, S. D. y W. G. Regehr** (2005). *Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids*. Neuron **45**(3): 419-431.
- Brose, N., K. Hofmann, Y. Hata y T. C. Sudhof** (1995). *Mammalian homologues of Caenorhabditis elegans unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins*. J Biol Chem **270**(42): 25273-25280.
- Brose, N., A. G. Petrenko, T. C. Sudhof y R. Jahn** (1992). *Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface*. Science **256**(5059): 1021-1025.
- Brown, S. P., P. K. Safo y W. G. Regehr** (2004). *Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels*. J Neurosci **24**(24): 5623-5631.
- Burre, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M. R. Etherton y T. C. Sudhof** (2010). *Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro*. Science **329**(5999): 1663-1667.
- Cadas, H., S. Gaillet, M. Beltramo, L. Venance y D. Piomelli** (1996). *Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP*. J Neurosci **16**(12): 3934-3942.
- Calakos, N., S. Schoch, T. C. Sudhof y R. C. Malenka** (2004). *Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release*. Neuron **42**(6): 889-896.
- Cao, H., F. Garcia y M. A. McNiven** (1998). *Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells*. Mol Biol Cell **9**(9): 2595-2609.
- Cardinali, D. P.** (2007). *Neurociencia aplicada. Sus fundamentos.*, 1ª Edición. Médica Panamericana.

- Carey, M. R., M. H. Myoga, K. R. McDaniels, G. Marsicano, B. Lutz, K. Mackie y W. G. Regehr (2011). *Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses*. J Neurophysiol **105**(2): 958-963.
- Cases-Langhoff, C., B. Voss, A. M. Garner, U. Appeltauer, K. Takei, S. Kindler, R. W. Veh, P. De Camilli, E. D. Gundelfinger y C. C. Garner (1996). *Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix*. Eur J Cell Biol **69**(3): 214-223.
- Castillo, P. E., R. Janz, T. C. Sudhof, T. Tzounopoulos, R. C. Malenka y R. A. Nicoll (1997). *Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus*. Nature **388**(6642): 590-593.
- Castillo, P. E., S. Schoch, F. Schmitz, T. C. Sudhof y R. C. Malenka (2002). *RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation*. Nature **415**(6869): 327-330.
- Castillo, P. E., T. J. Younts, A. E. Chavez y Y. Hashimoto-dani (2012). *Endocannabinoid signaling and synaptic function*. Neuron **76**(1): 70-81.
- Ceccarelli, B., W. P. Hurlbut y A. Mauro (1973). *Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction*. J Cell Biol **57**(2): 499-524.
- Cerminara, N. L., E. J. Lang, R. V. Sillitoe y R. Apps (2015). *Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits*. Nat Rev Neurosci **16**(2): 79-93.
- Citri, A. y R. C. Malenka (2008). *Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms*. Neuropsychopharmacology **33**(1): 18-41.
- Clayton, E. L. y M. A. Cousin (2009). *The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles*. J Neurochem **111**(4): 901-914.
- Clayton, E. L., G. J. Evans y M. A. Cousin (2007). *Activity-dependent control of bulk endocytosis by protein dephosphorylation in central nerve terminals*. J Physiol **585**(Pt 3): 687-691.
- Clayton, E. L., G. J. Evans y M. A. Cousin (2008). *Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation*. J Neurosci **28**(26): 6627-6632.
- Clayton, E. L., N. Sue, K. J. Smillie, T. O'Leary, N. Bache, G. Cheung, A. R. Cole, D. J. Wyllie, C. Sutherland, P. J. Robinson y M. A. Cousin (2010). *Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles*. Nat Neurosci **13**(7): 845-851.
- Conn, P. J. y J. P. Pin (1997). *Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 205-237.
- Conner, S. D. y S. L. Schmid (2003). *Regulated portals of entry into the cell*. Nature **422**(6927): 37-44.

- Coppola, T., S. Magnin-Luthi, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, G. Schiavo y R. Regazzi** (2001). *Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca<sup>2+</sup> channels, SNAP-25, and synaptotagmin*. J Biol Chem **276**(35): 32756-32762.
- Cousin, M. A.** (2008). *Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function*. Curr Protoc Neurosci **Chapter 2**: Unit 2 6.
- Cousin, M. A. y G. J. Evans** (2011). *Activation of silent and weak synapses by cAMP-dependent protein kinase in cultured cerebellar granule neurons*. J Physiol **589**(Pt 8): 1943-1955.
- Couteaux, R. y M. Pecot-Dechavassine** (1970). *[Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **271**(25): 2346-2349.
- Cowan, W. M., T. C. Südhof, C. F. Stevens y Howard Hughes Medical Institute.** (2001). *Synapses*. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Cravatt, B. F., K. Demarest, M. P. Patricelli, M. H. Bracey, D. K. Giang, B. R. Martin y A. H. Lichtman** (2001). *Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9371-9376.
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner y N. B. Gilula** (1996). *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides*. Nature **384**(6604): 83-87.
- Crawford, D. C., C. Y. Chang, K. L. Hyrc y S. Mennerick** (2011). *Calcium-independent inhibitory G-protein signaling induces persistent presynaptic muting of hippocampal synapses*. J Neurosci **31**(3): 979-991.
- Crawford, D. C., X. Jiang, A. Taylor, K. L. Moulder y S. Mennerick** (2012). *Differential requirement for protein synthesis in presynaptic unmuting and muting in hippocampal glutamate terminals*. PLoS One **7**(12): e51930.
- Crawford, D. C. y S. Mennerick** (2012). *Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release*. Neuroscientist **18**(3): 216-223.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M. R. Wenk, A. Luthi, W. T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S. B. Shears, R. A. Flavell, D. A. McCormick y P. De Camilli** (1999). *Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling*. Cell **99**(2): 179-188.
- Chanda, P. K., Y. Gao, L. Mark, J. Btesh, B. W. Strassle, P. Lu, M. J. Piesla, M. Y. Zhang, B. Bingham, A. Uveges, D. Kowal, D. Garbe, E. V. Kouranova, R. H. Ring, B. Bates, M. N. Pangalos, J. D. Kennedy, G. T. Whiteside y T. A. Samad** (2010). *Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system*. Mol Pharmacol **78**(6): 996-1003.

**Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter y T. C. Sudhof** (2005). *Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration*. *Cell* **123**(3): 383-396.

**Charpier, S., J. C. Behrends, A. Triller, D. S. Faber y H. Korn** (1995). *"Latent" inhibitory connections become functional during activity-dependent plasticity*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1): 117-120.

**Chen, X., S. Barg y W. Almers** (2008). *Release of the styryl dyes from single synaptic vesicles in hippocampal neurons*. *J Neurosci* **28**(8): 1894-1903.

**Cheung, G. y M. A. Cousin** (2012). *Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes*. *J Neurosci* **32**(17): 6014-6023.

**Cheung, G. y M. A. Cousin** (2013). *Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin*. *J Neurosci* **33**(8): 3370-3379.

**Chevaleyre, V. y P. E. Castillo** (2003). *Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability*. *Neuron* **38**(3): 461-472.

**Chevaleyre, V., B. D. Heifets, P. S. Kaeser, T. C. Sudhof y P. E. Castillo** (2007). *Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha*. *Neuron* **54**(5): 801-812.

**Chevaleyre, V., K. A. Takahashi y P. E. Castillo** (2006). *Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS*. *Annu Rev Neurosci* **29**: 37-76.

**Chicka, M. C., E. Hui, H. Liu y E. R. Chapman** (2008). *Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca<sup>2+</sup>*. *Nat Struct Mol Biol* **15**(8): 827-835.

**Childers, S. R. y S. A. Deadwyler** (1996). *Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors*. *Biochem Pharmacol* **52**(6): 819-827.

**Choi, D. W.** (1992). *Bench to bedside: the glutamate connection*. *Science* **258**(5080): 241-243.

**D'Angelo, E. y S. Casali** (2012). *Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition*. *Front Neural Circuits* **6**: 116.

**Dai, Y., H. Taru, S. L. Deken, B. Grill, B. Ackley, M. L. Nonet y Y. Jin** (2006). *SYD-2 Liprin-alpha organizes presynaptic active zone formation through ELKS*. *Nat Neurosci* **9**(12): 1479-1487.

**Danbolt, N. C.** (2001). *Glutamate uptake*. *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105.

**Darcy, K. J., K. Staras, L. M. Collinson y Y. Goda** (2006). *Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons*. *Nat Neurosci* **9**(3): 315-321.

- Davletov, B. A. y T. C. Sudhof** (1993). *A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca<sup>2+</sup>/phospholipid binding*. J Biol Chem **268**(35): 26386-26390.
- De Camilli, P., V. Haucke, K. Takei y E. Mugnaini** (2001). *The structure of synapses*. Synapses. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press: 89–133.
- de Lange, R. P., A. D. de Roos y J. G. Borst** (2003). *Two modes of vesicle recycling in the rat calyx of Held*. J Neurosci **23**(31): 10164-10173.
- De Petrocellis, L. y V. Di Marzo** (2010). *Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels*. J Neuroimmune Pharmacol **5**(1): 103-121.
- de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer y J. L. Bos** (2000). *Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs*. J Biol Chem **275**(27): 20829-20836.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer y J. L. Bos** (1998). *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature **396**(6710): 474-477.
- Deak, F., Y. Xu, W. P. Chang, I. Dulubova, M. Khvotchev, X. Liu, T. C. Sudhof y J. Rizo** (2009). *Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming*. J Cell Biol **184**(5): 751-764.
- Dean, P., J. Porrill, C. F. Ekerot y H. Jorntell** (2010). *The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: experimental and computational evidence*. Nat Rev Neurosci **11**(1): 30-43.
- den Boon, F. S., P. Chameau, Q. Schaafsma-Zhao, W. van Aken, M. Bari, S. Oddi, C. G. Kruse, M. Maccarrone, W. J. Wadman y T. R. Werkman** (2012). *Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3534-3539.
- Deng, L., P. S. Kaeser, W. Xu y T. C. Südhof** (2011). *RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Autoinhibitory Homodimerization of Munc13*. Neuron **69**(2): 317-331.
- Denker, A., I. Bethani, K. Krohnert, C. Korber, H. Horstmann, B. G. Wilhelm, S. V. Barysch, T. Kuner, E. Neher y S. O. Rizzoli** (2011). *A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(41): 17177-17182.
- Denker, A., K. Krohnert, J. Buckers, E. Neher y S. O. Rizzoli** (2011). *The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(41): 17183-17188.
- Derouiche, A. y M. Frotscher** (1991). *Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation*. Brain Res **552**(2): 346-350.

- Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger y R. Mechoulam** (1992). *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. *Science* **258**(5090): 1946-1949.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, F. Fezza, A. Ligresti y T. Bisogno** (2002). *Anandamide receptors*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**(2-3): 377-391.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz y D. Piomelli** (1994). *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons*. *Nature* **372**(6507): 686-691.
- Dinh, T. P., D. Carpenter, F. M. Leslie, T. F. Freund, I. Katona, S. L. Sensi, S. Kathuria y D. Piomelli** (2002). *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10819-10824.
- Dinh, T. P., S. Kathuria y D. Piomelli** (2004). *RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. *Mol Pharmacol* **66**(5): 1260-1264.
- Diril, M. K., M. Wienisch, N. Jung, J. Klingauf y V. Haucke** (2006). *Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling*. *Dev Cell* **10**(2): 233-244.
- Dittman, J. y T. A. Ryan** (2009). *Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 133-160.
- Dittman, J. S., A. C. Kreitzer y W. G. Regehr** (2000). *Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals*. *J Neurosci* **20**(4): 1374-1385.
- Dulubova, I., M. Khvotchev, S. Liu, I. Huryeva, T. C. Sudhof y J. Rizo** (2007). *Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2697-2702.
- Dulubova, I., X. Lou, J. Lu, I. Huryeva, A. Alam, R. Schneggenburger, T. C. Sudhof y J. Rizo** (2005). *A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?* *EMBO J* **24**(16): 2839-2850.
- Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Sudhof y J. Rizo** (1999). *A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18*. *EMBO J* **18**(16): 4372-4382.
- Dzhura, I., O. G. Chepurny, C. A. Leech, M. W. Roe, E. Dzhura, X. Xu, Y. Lu, F. Schwede, H. G. Genieser, A. V. Smrcka y G. G. Holz** (2011). *Phospholipase C-epsilon links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans*. *Islets* **3**(3): 121-128.
- Edeling, M. A., C. Smith y D. Owen** (2006). *Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 32-44.



- Eid, T., N. Tu, T. S. Lee y J. C. Lai (2013). *Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy*. *Neurochem Int* **63**(7): 670-681.
- Evans, G. J. O. (2007). *Synaptic signalling in cerebellar plasticity*. *Biology of the Cell* **99**(7): 363-378.
- Faber, D. S., J. W. Lin y H. Korn (1991). *Silent synaptic connections and their modifiability*. *Ann N Y Acad Sci* **627**: 151-164.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, A. T. Brunger y R. Jahn (1998). *Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15781-15786.
- Fei, H., A. Grygoruk, E. S. Brooks, A. Chen y D. E. Krantz (2008). *Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters*. *Traffic* **9**(9): 1425-1436.
- Fenster, S. D., W. J. Chung, R. Zhai, C. Cases-Langhoff, B. Voss, A. M. Garner, U. Kaempfer, S. Kindler, E. D. Gundelfinger y C. C. Garner (2000). *Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon*. *Neuron* **25**(1): 203-214.
- Ferguson, S. M., G. Brasnjo, M. Hayashi, M. Wolfel, C. Collesi, S. Giovedi, A. Raimondi, L. W. Gong, P. Ariel, S. Paradise, E. O'Toole, R. Flavell, O. Cremona, G. Miesenböck, T. A. Ryan y P. De Camilli (2007). *A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis*. *Science* **316**(5824): 570-574.
- Ferguson, S. M. y P. De Camilli (2012). *Dynamin, a membrane-remodelling GTPase*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(2): 75-88.
- Fernandes, H. B., S. Riordan, T. Nomura, C. L. Remmers, S. Kraniotis, J. J. Marshall, L. Kukreja, R. Vassar y A. Contractor (2015). *Epac2 Mediates cAMP-Dependent Potentiation of Neurotransmission in the Hippocampus*. *J Neurosci* **35**(16): 6544-6553.
- Ferrero, J. J., A. M. Alvarez, J. Ramirez-Franco, M. C. Godino, D. Bartolome-Martin, C. Aguado, M. Torres, R. Lujan, F. Ciruela y J. Sanchez-Prieto (2013). *beta-adrenergic receptors activate Epac, translocate Munc13-1 and enhance the Rab3A-Rim1alpha interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals*. *J Biol Chem* **288**(43): 31370-31385.
- Fesce, R., F. Grohovaz, F. Valtorta y J. Meldolesi (1994). *Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?* *Trends Cell Biol* **4**(1): 1-4.
- Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans y H. T. McMahon (2002). *Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin*. *Nature* **419**(6905): 361-366.
- Freneau, R. T., Jr., J. Burman, T. Qureshi, C. H. Tran, J. Proctor, J. Johnson, H. Zhang, D. Sulzer, D. R. Copenhagen, J. Storm-Mathisen, R. J. Reimer, F. A. Chaudhry y R. H. Edwards (2002). *The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14488-14493.

- Freund, T. F., I. Katona y D. Piomelli** (2003). *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. *Physiol Rev* **83**(3): 1017-1066.
- Fujimoto, K., T. Shibasaki, N. Yokoi, Y. Kashima, M. Matsumoto, T. Sasaki, N. Tajima, T. Iwanaga y S. Seino** (2002). *Piccolo, a Ca<sup>2+</sup> sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis*. *J Biol Chem* **277**(52): 50497-50502.
- Gandhi, S. P. y C. F. Stevens** (2003). *Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging*. *Nature* **423**(6940): 607-613.
- Gao, Y., D. V. Vasilyev, M. B. Goncalves, F. V. Howell, C. Hobbs, M. Reisenberg, R. Shen, M. Y. Zhang, B. W. Strassle, P. Lu, L. Mark, M. J. Piesla, K. Deng, E. V. Kouranova, R. H. Ring, G. T. Whiteside, B. Bates, F. S. Walsh, G. Williams, M. N. Pangalos, T. A. Samad y P. Doherty** (2010). *Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice*. *J Neurosci* **30**(6): 2017-2024.
- Gegelashvili, G. y A. Schousboe** (1997). *High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity*. *Mol Pharmacol* **52**(1): 6-15.
- Gekel, I. y E. Neher** (2008). *Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses*. *J Neurosci* **28**(32): 7991-8002.
- Gelinas, J. N., J. L. Banko, M. M. Peters, E. Klann, E. J. Weeber y P. V. Nguyen** (2008). *Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus*. *Learn Mem* **15**(6): 403-411.
- Gerard, C., C. Mollereau, G. Vassart y M. Parmentier** (1990). *Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA*. *Nucleic Acids Res* **18**(23): 7142.
- Gerber, S. H., J. C. Rah, S. W. Min, X. Liu, H. de Wit, I. Dulubova, A. C. Meyer, J. Rizo, M. Arancillo, R. E. Hammer, M. Verhage, C. Rosenmund y T. C. Sudhof** (2008). *Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion*. *Science* **321**(5895): 1507-1510.
- Gerdeman, G. L., J. Ronesi y D. M. Lovinger** (2002). *Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum*. *Nat Neurosci* **5**(5): 446-451.
- Giraud, C. G., W. S. Eng, T. J. Melia y J. E. Rothman** (2006). *A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis*. *Science* **313**(5787): 676-680.
- Godino, M. C., M. Torres y J. Sanchez-Prieto** (2005). *Inhibition of N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by cannabinoid receptors in single cerebrocortical nerve terminals*. *FEBS Lett* **579**(3): 768-772.
- Gracheva, E. O., G. Hadwiger, M. L. Nonet y J. E. Richmond** (2008). *Direct interactions between C. elegans RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density*. *Neurosci Lett* **444**(2): 137-142.

- Grandoch, M., S. S. Roscioni y M. Schmidt** (2010). *The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function*. *Br J Pharmacol* **159**(2): 265-284.
- Granseth, B., B. Odermatt, S. J. Royle y L. Lagnado** (2006). *Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses*. *Neuron* **51**(6): 773-786.
- Grueter, B. A., G. Brasnjo y R. C. Malenka** (2010). *Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens*. *Nat Neurosci* **13**(12): 1519-1525.
- Guan, R., H. Dai, S. C. Harrison y T. Kirchhausen** (2010). *Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding*. *Structure* **18**(9): 1191-1198.
- Gulyas, A. I., B. F. Cravatt, M. H. Bracey, T. P. Dinh, D. Piomelli, F. Boscia y T. F. Freund** (2004). *Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala*. *Eur J Neurosci* **20**(2): 441-458.
- Guo, J. y S. R. Ikeda** (2004). *Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons*. *Mol Pharmacol* **65**(3): 665-674.
- Hallermann, S., A. Fejtova, H. Schmidt, A. Weyhersmuller, R. A. Silver, E. D. Gundelfinger y J. Eilers** (2010). *Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse*. *Neuron* **68**(4): 710-723.
- Han, Y., P. S. Kaeser, T. C. Sudhof y R. Schneggenburger** (2011). *RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone*. *Neuron* **69**(2): 304-316.
- Hanson, P. I., R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn y J. E. Heuser** (1997). *Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy*. *Cell* **90**(3): 523-535.
- Harata, N., T. A. Ryan, S. J. Smith, J. Buchanan y R. W. Tsien** (2001). *Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12748-12753.
- Harata, N. C., S. Choi, J. L. Pyle, A. M. Aravanis y R. W. Tsien** (2006). *Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods*. *Neuron* **49**(2): 243-256.
- Harkany, T., K. Mackie y P. Doherty** (2008). *Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage*. *Curr Opin Neurobiol* **18**(3): 338-345.
- Hashimoto, M. y M. Hibi** (2012). *Development and evolution of cerebellar neural circuits*. *Dev Growth Differ* **54**(3): 373-389.

- Hashimotodani, Y., T. Ohno-Shosaku, H. Tsubokawa, H. Ogata, K. Emoto, T. Maejima, K. Araishi, H. S. Shin y M. Kano (2005). *Phospholipase C $\beta$  serves as a coincidence detector through its Ca<sup>2+</sup> dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal*. *Neuron* **45**(2): 257-268.
- Hata, Y., C. A. Slaughter y T. C. Sudhof (1993). *Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin*. *Nature* **366**(6453): 347-351.
- Haucke, V. y P. De Camilli (1999). *AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs*. *Science* **285**(5431): 1268-1271.
- Hayashi, M., A. Raimondi, E. O'Toole, S. Paradise, C. Collesi, O. Cremona, S. M. Ferguson y P. De Camilli (2008). *Cell- and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 2175-2180.
- Heifets, B. D. y P. E. Castillo (2009). *Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity*. *Annu Rev Physiol* **71**: 283-306.
- Heifets, B. D., V. Chevalere y P. E. Castillo (2008). *Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10250-10255.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa y K. C. Rice (1990). *Cannabinoid receptor localization in brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(5): 1932-1936.
- Herrero, I. y J. Sanchez-Prieto (1996). *cAMP-dependent facilitation of glutamate release by beta-adrenergic receptors in cerebrocortical nerve terminals*. *J Biol Chem* **271**(48): 30554-30560.
- Heuser, J. E. y T. S. Reese (1973). *Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction*. *J Cell Biol* **57**(2): 315-344.
- Hillard, C. J., K. M. Weinlander y K. L. Stuhr (2012). *Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence*. *Neuroscience* **204**: 207-229.
- Hobson, R. J., Q. Liu, S. Watanabe y E. M. Jorgensen (2011). *Complexin maintains vesicles in the primed state in C. elegans*. *Curr Biol* **21**(2): 106-113.
- Holderith, N., A. Lorincz, G. Katona, B. Rózsa, A. Kulik, M. Watanabe y Z. Nusser (2012). *Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone*. *Nat Neurosci* **15**(7): 988-997.
- Hollmann, M. y S. Heinemann (1994). *Cloned glutamate receptors*. *Annu Rev Neurosci* **17**: 31-108.

**Honore, T., J. Lauridsen y P. Krogsgaard-Larsen** (1982). *The binding of [3H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid, to rat brain membranes*. J Neurochem **38**(1): 173-178.

**Howlett, A. C., J. M. Qualy y L. L. Khachatrian** (1986). *Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs*. Mol Pharmacol **29**(3): 307-313.

**Hua, Z., S. Leal-Ortiz, S. M. Foss, C. L. Waites, C. C. Garner, S. M. Voglmaier y R. H. Edwards** (2011). *v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools*. Neuron **71**(3): 474-487.

**Huang, C. C. y K. S. Hsu** (2006). *Presynaptic mechanism underlying cAMP-induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons*. Mol Pharmacol **69**(3): 846-856.

**Huang, Y. Y., X. C. Li y E. R. Kandel** (1994). *cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase*. Cell **79**(1): 69-79.

**Huang, Y. Y., S. S. Zakharenko, S. Schoch, P. S. Kaeser, R. Janz, T. C. Sudhof, S. A. Siegelbaum y E. R. Kandel** (2005). *Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9365-9370.

**Hucho, T. B., O. A. Dina y J. D. Levine** (2005). *Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism*. J Neurosci **25**(26): 6119-6126.

**Isaac, J. T., R. A. Nicoll y R. C. Malenka** (1995). *Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP*. Neuron **15**(2): 427-434.

**Isope, P. y B. Barbour** (2002). *Properties of unitary granule cell-->Purkinje cell synapses in adult rat cerebellar slices*. J Neurosci **22**(22): 9668-9678.

**Ito, M.** (1984). *The cerebellum and neural control*. New York, Raven Press.

**Ito, M.** (2001). *Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles*. Physiol Rev **81**(3): 1143-1195.

**Iwabuchi, S., Y. Kakazu, J. Y. Koh, K. M. Goodman y N. C. Harata** (2014). *Examination of synaptic vesicle recycling using FM dyes during evoked, spontaneous, and miniature synaptic activities*. J Vis Exp(85): e50557.

**Jacobson, S. y E. M. Marcus** (2008). *Neuroanatomy for the neuroscientist*. New York, NY, Springer.

**Jahn, R. y D. Fasshauer** (2012). *Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles*. Nature **490**(7419): 201-207.

**Jahn, R. y R. H. Scheller** (2006). *SNAREs--engines for membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 631-643.

**Jiang, X., P. E. Litkowski, A. A. Taylor, Y. Lin, B. J. Snider y K. L. Moulder** (2010). *A role for the ubiquitin-proteasome system in activity-dependent presynaptic silencing*. J Neurosci **30**(5): 1798-1809.

**Johnson, D. A., P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, M. Madhusudan y S. S. Taylor** (2001). *Dynamics of cAMP-dependent protein kinase*. Chem Rev **101**(8): 2243-2270.

**Johnson, J. W. y P. Ascher** (1987). *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons*. Nature **325**(6104): 529-531.

**Jorquera, R. A., S. Huntwork-Rodriguez, Y. Akbergenova, R. W. Cho y J. T. Littleton** (2012). *Complexin controls spontaneous and evoked neurotransmitter release by regulating the timing and properties of synaptotagmin activity*. J Neurosci **32**(50): 18234-18245.

**Junge, H. J., J. S. Rhee, O. Jahn, F. Varoqueaux, J. Spiess, M. N. Waxham, C. Rosenmund y N. Brose** (2004). *Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity*. Cell **118**(3): 389-401.

**Kaesler-Woo, Y. J., X. Yang y T. C. Sudhof** (2012). *C-terminal complexin sequence is selectively required for clamping and priming but not for Ca<sup>2+</sup> triggering of synaptic exocytosis*. J Neurosci **32**(8): 2877-2885.

**Kaesler, P. S., L. Deng, Y. Wang, I. Dulubova, X. Liu, J. Rizo y T. C. Sudhof** (2011). *RIM proteins tether Ca<sup>2+</sup> channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction*. Cell **144**(2): 282-295.

**Kaesler, P. S., H. B. Kwon, J. Blundell, V. Chevalleyre, W. Morishita, R. C. Malenka, C. M. Powell, P. E. Castillo y T. C. Sudhof** (2008). *RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning*. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14680-14685.

**Kaesler, P. S., H. B. Kwon, C. Q. Chiu, L. Deng, P. E. Castillo y T. C. Sudhof** (2008). *RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions*. J Neurosci **28**(50): 13435-13447.

**Kaesler, P. S. y T. C. Sudhof** (2005). *RIM function in short- and long-term synaptic plasticity*. Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1345-1349.

**Kandel, E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessell** (2000). *Principles of neural science*. 4ª Edición. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.

**Kaneko, M. y T. Takahashi** (2004). *Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation*. J Neurosci **24**(22): 5202-5208.

- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimotodani, M. Uchigashima y M. Watanabe (2009). *Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission*. *Physiol Rev* **89**(1): 309-380.
- Katona, I. y T. F. Freund (2012). *Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain*. *Annu Rev Neurosci* **35**: 529-558.
- Katona, I., B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie y T. F. Freund (1999). *Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons*. *J Neurosci* **19**(11): 4544-4558.
- Katona, I., G. M. Urban, M. Wallace, C. Ledent, K. M. Jung, D. Piomelli, K. Mackie y T. F. Freund (2006). *Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses*. *J Neurosci* **26**(21): 5628-5637.
- Kaufmann, N., J. DeProto, R. Ranjan, H. Wan y D. Van Vactor (2002). *Drosophila liprin-alpha and the receptor phosphatase Dlar control synapse morphogenesis*. *Neuron* **34**(1): 27-38.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman y A. M. Graybiel (1998). *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. *Science* **282**(5397): 2275-2279.
- Kerchner, G. A. y R. A. Nicoll (2008). *Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP*. *Nat Rev Neurosci* **9**(11): 813-825.
- Kim, J., M. Isokawa, C. Ledent y B. E. Alger (2002). *Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus*. *J Neurosci* **22**(23): 10182-10191.
- Kim, S. H. y T. A. Ryan (2010). *CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release*. *Neuron* **67**(5): 797-809.
- Kintscher, M., C. Wozny, F. W. Jochenning, D. Schmitz y J. Breustedt (2013). *Role of RIM1alpha in short- and long-term synaptic plasticity at cerebellar parallel fibres*. *Nat Commun* **4**: 2392.
- Kittel, R. J., C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann y S. J. Sigrist (2006). *Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release*. *Science* **312**(5776): 1051-1054.
- Kiyonaka, S., M. Wakamori, T. Miki, Y. Uriu, M. Nonaka, H. Bito, A. M. Beedle, E. Mori, Y. Hara, M. De Waard, M. Kanagawa, M. Itakura, M. Takahashi, K. P. Campbell y Y. Mori (2007). *RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels*. *Nat Neurosci* **10**(6): 691-701.
- Ko, J., M. Na, S. Kim, J. R. Lee y E. Kim (2003). *Interaction of the ERC family of RIM-binding proteins with the liprin-alpha family of multidomain proteins*. *J Biol Chem* **278**(43): 42377-42385.

- Ko, J., C. Yoon, G. Piccoli, H. S. Chung, K. Kim, J. R. Lee, H. W. Lee, H. Kim, C. Sala y E. Kim** (2006). *Organization of the presynaptic active zone by ERC2/CAST1-dependent clustering of the tandem PDZ protein syntenin-1*. J Neurosci **26**(3): 963-970.
- Koch, H., K. Hofmann y N. Brose** (2000). *Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform*. Biochem J **349**(Pt 1): 247-253.
- Koenig, J. H. y K. Ikeda** (1989). *Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval*. J Neurosci **9**(11): 3844-3860.
- Koester, H. J. y D. Johnston** (2005). *Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses*. Science **308**(5723): 863-866.
- Koo, S. J., S. Markovic, D. Puchkov, C. C. Mahrenholz, F. Beceren-Braun, T. Maritzen, J. Darnedde, R. Volkmer, H. Oschkinat y V. Haucke** (2011). *SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13540-13545.
- Kopperud, R., A. E. Christensen, E. Kjarland, K. Viste, H. Kleivdal y S. O. Doskeland** (2002). *Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions*. J Biol Chem **277**(16): 13443-13448.
- Koushika, S. P., J. E. Richmond, G. Hadwiger, R. M. Weimer, E. M. Jorgensen y M. L. Nonet** (2001). *A post-docking role for active zone protein Rim*. Nat Neurosci **4**(10): 997-1005.
- Kreitzer, A. C. y W. G. Regehr** (2001). *Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells*. Neuron **29**(3): 717-727.
- Kuromi, H. y Y. Kidokoro** (2003). *Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the Drosophila neuromuscular junction*. J Neurocytol **32**(5-8): 551-565.
- Kwan, E. P., X. Gao, Y. M. Leung y H. Y. Gaisano** (2007). *Activation of exchange protein directly activated by cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A regulate common and distinct steps in promoting plasma membrane exocytic and granule-to-granule fusions in rat islet beta cells*. Pancreas **35**(3): e45-54.
- Laurent, A. C., M. Breckler, M. Berthouze y F. Lezoualc'h** (2012). *Role of Epac in brain and heart*. Biochem Soc Trans **40**(1): 51-57.
- Lazarevic, V., C. Schone, M. Heine, E. D. Gundelfinger y A. Fejtova** (2011). *Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing*. J Neurosci **31**(28): 10189-10200.



- Leenders, A. G., F. H. Lopes da Silva, W. E. Ghijsen y M. Verhage** (2001). *Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals*. *Mol Biol Cell* **12**(10): 3095-3102.
- Leitz, J. y E. T. Kavalali** (2011). *Ca<sup>2</sup>(+) influx slows single synaptic vesicle endocytosis*. *J Neurosci* **31**(45): 16318-16326.
- Lerma, J.** (2003). *Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission*. *Nat Rev Neurosci* **4**(6): 481-495.
- Lev-Ram, V., T. Jiang, J. Wood, D. S. Lawrence y R. Y. Tsien** (1997). *Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca<sup>2+</sup> in the induction of cerebellar long-term depression*. *Neuron* **18**(6): 1025-1038.
- Liao, D., N. A. Hessler y R. Malinow** (1995). *Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice*. *Nature* **375**(6530): 400-404.
- Limbach, C., M. M. Laue, X. Wang, B. Hu, N. Thiede, G. Hultqvist y M. W. Kilimann** (2011). *Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(31): E392-401.
- Linden, D. J. y S. Ahn** (1999). *Activation of presynaptic cAMP-dependent protein kinase is required for induction of cerebellar long-term potentiation*. *J Neurosci* **19**(23): 10221-10227.
- Liu, C., M. Takahashi, Y. Li, S. Song, T. J. Dillon, U. Shinde y P. J. Stork** (2008). *Ras is required for the cyclic AMP-dependent activation of Rap1 via Epac2*. *Mol Cell Biol* **28**(23): 7109-7125.
- Liu, K. S., M. Siebert, S. Mertel, E. Knoche, S. Wegener, C. Wichmann, T. Matkovic, K. Muhammad, H. Depner, C. Mettke, J. Buckers, S. W. Hell, M. Muller, G. W. Davis, D. Schmitz y S. J. Sigrist** (2011). *RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release*. *Science* **334**(6062): 1565-1569.
- Lonart, G., S. Schoch, P. S. Kaeser, C. J. Larkin, T. C. Sudhof y D. J. Linden** (2003). *Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses*. *Cell* **115**(1): 49-60.
- Losonczy, A., A. A. Biro y Z. Nusser** (2004). *Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1362-1367.
- Lu, J., H. Li, Y. Wang, T. C. Sudhof y J. Rizo** (2005). *Solution structure of the RIM1alpha PDZ domain in complex with an ELKS1b C-terminal peptide*. *J Mol Biol* **352**(2): 455-466.
- Lu, J., M. Machius, I. Dulubova, H. Dai, T. C. Sudhof, D. R. Tomchick y J. Rizo** (2006). *Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch*. *PLoS Biol* **4**(7): e192.

- Lucchesi, O., M. C. Ruete, M. A. Bustos, M. F. Quevedo y C. N. Tomes** (2016). *The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLCepsilon/IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis*. *Biochim Biophys Acta* **1863**(4): 544-561.
- Llano, I., N. Leresche y A. Marty** (1991). *Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents*. *Neuron* **6**(4): 565-574.
- Ma, C., W. Li, Y. Xu y J. Rizo** (2011). *Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex*. *Nat Struct Mol Biol* **18**(5): 542-549.
- Ma, C., L. Su, A. B. Seven, Y. Xu y J. Rizo** (2013). *Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release*. *Science* **339**(6118): 421-425.
- Ma, L., L. Zablow, E. R. Kandel y S. A. Siegelbaum** (1999). *Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures*. *Nat Neurosci* **2**(1): 24-30.
- Mackie, K.** (2005). *Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization*. *Life Sci* **77**(14): 1667-1673.
- Mackie, K., Y. Lai, R. Westenbroek y R. Mitchell** (1995). *Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor*. *J Neurosci* **15**(10): 6552-6561.
- Maejima, T., K. Hashimoto, T. Yoshida, A. Aiba y M. Kano** (2001). *Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors*. *Neuron* **31**(3): 463-475.
- Maejima, T., S. Oka, Y. Hashimoto, T. Ohno-Shosaku, A. Aiba, D. Wu, K. Waku, T. Sugiura y M. Kano** (2005). *Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca<sup>2+</sup>-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C $\beta$ 4 signaling cascade in the cerebellum*. *J Neurosci* **25**(29): 6826-6835.
- Marcaggi, P.** (2015). *Cerebellar endocannabinoids: retrograde signaling from purkinje cells*. *Cerebellum* **14**(3): 341-353.
- Marsicano, G., C. T. Wotjak, S. C. Azad, T. Bisogno, G. Rammes, M. G. Cascio, H. Hermann, J. Tang, C. Hofmann, W. Zieglansberger, V. Di Marzo y B. Lutz** (2002). *The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories*. *Nature* **418**(6897): 530-534.
- Martin, J. A., Z. Hu, K. M. Fenz, J. Fernandez y J. S. Dittman** (2011). *Complexin has opposite effects on two modes of synaptic vesicle fusion*. *Curr Biol* **21**(2): 97-105.
- Martinez-Hernandez, A., K. P. Bell y M. D. Norenberg** (1977). *Glutamine synthetase: glial localization in brain*. *Science* **195**(4284): 1356-1358.

- Mato, S., M. Lafourcade, D. Robbe, Y. Bakiri y O. J. Manzoni** (2008). *Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca<sup>++</sup> channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens*. *Neuropharmacology* **54**(1): 87-94.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young y T. I. Bonner** (1990). *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. *Nature* **346**(6284): 561-564.
- Maximov, A., J. Tang, X. Yang, Z. P. Pang y T. C. Sudhof** (2009). *Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion*. *Science* **323**(5913): 516-521.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook y P. B. Guthrie** (1984). *Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones*. *Nature* **309**(5965): 261-263.
- McMahon, H. T., M. M. Kozlov y S. Martens** (2010). *Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond*. *Cell* **140**(5): 601-605.
- McPherson, P. S., E. P. Garcia, V. I. Slepnev, C. David, X. Zhang, D. Grabs, W. S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto y P. De Camilli** (1996). *A presynaptic inositol-5-phosphatase*. *Nature* **379**(6563): 353-357.
- Mechoulam, R. y L. A. Parker** (2013). *The endocannabinoid system and the brain*. *Annu Rev Psychol* **64**: 21-47.
- Meijering, E., M. Jacob, J. C. Sarria, P. Steiner, H. Hirling y M. Unser** (2004). *Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images*. *Cytometry A* **58**(2): 167-176.
- Miesenbock, G., D. A. De Angelis y J. E. Rothman** (1998). *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*. *Nature* **394**(6689): 192-195.
- Miller, S. E., D. A. Sahlender, S. C. Graham, S. Honing, M. S. Robinson, A. A. Peden y D. J. Owen** (2011). *The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM*. *Cell* **147**(5): 1118-1131.
- Miller, T. M. y J. E. Heuser** (1984). *Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction*. *J Cell Biol* **98**(2): 685-698.
- Misura, K. M., R. H. Scheller y W. I. Weis** (2000). *Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex*. *Nature* **404**(6776): 355-362.
- Mittelstaedt, T., E. Alvarez-Baron y S. Schoch** (2010). *RIM proteins and their role in synapse function*. *Biol Chem* **391**(6): 599-606.
- Mittelstaedt, T. y S. Schoch** (2007). *Structure and evolution of RIM-BP genes: identification of a novel family member*. *Gene* **403**(1-2): 70-79.

- Monaghan, D. T., R. J. Bridges y C. W. Cotman** (1989). *The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**: 365-402.
- Morris, S. A., A. Mann y E. Ungewickell** (1990). *Analysis of 100-180-kDa phosphoproteins in clathrin-coated vesicles from bovine brain*. *J Biol Chem* **265**(6): 3354-3357.
- Moulder, K. L., X. Jiang, C. Chang, A. A. Taylor, A. M. Benz, A. C. Conti, L. J. Muglia y S. Mennerick** (2008). *A specific role for Ca<sup>2+</sup>-dependent adenylyl cyclases in recovery from adaptive presynaptic silencing*. *J Neurosci* **28**(20): 5159-5168.
- Moulder, K. L., X. Jiang, A. A. Taylor, J. W. Olney y S. Mennerick** (2006). *Physiological activity depresses synaptic function through an effect on vesicle priming*. *J Neurosci* **26**(24): 6618-6626.
- Moulder, K. L., J. P. Meeks, A. A. Shute, C. K. Hamilton, G. de Erausquin y S. Mennerick** (2004). *Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization*. *Neuron* **42**(3): 423-435.
- Mukherjee, K., X. Yang, S. H. Gerber, H. B. Kwon, A. Ho, P. E. Castillo, X. Liu y T. C. Sudhof** (2010). *Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(14): 6504-6509.
- Munoz-Llancao, P., D. R. Henriquez, C. Wilson, F. Bodaleo, E. W. Boddeke, F. Lezoualc'h, M. Schmidt y C. Gonzalez-Billault** (2015). *Exchange Protein Directly Activated by cAMP (EPAC) Regulates Neuronal Polarization through Rap1B*. *J Neurosci* **35**(32): 11315-11329.
- Neale, E. A., P. G. Nelson, R. L. Macdonald, C. N. Christian y L. M. Bowers** (1983). *Synaptic interactions between mammalian central neurons in cell culture. III. Morphophysiological correlates of quantal synaptic transmission*. *J Neurophysiol* **49**(6): 1459-1468.
- Nevian, T. y B. Sakmann** (2006). *Spine Ca<sup>2+</sup> signaling in spike-timing-dependent plasticity*. *J Neurosci* **26**(43): 11001-11013.
- Newton, A. J., T. Kirchhausen y V. N. Murthy** (2006). *Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17955-17960.
- Ng, M., R. D. Roorda, S. Q. Lima, B. V. Zemelman, P. Morcillo y G. Miesenbock** (2002). *Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly*. *Neuron* **36**(3): 463-474.
- Nicoll, R. A.** (2003). *Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1432): 721-726.
- Niswender, C. M. y P. J. Conn** (2010). *Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 295-322.

- Norenberg, M. D.** (1979). *Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system*. J Histochem Cytochem **27**(3): 756-762.
- Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet y A. Prochiantz** (1984). *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones*. Nature **307**(5950): 462-465.
- Ohno-Shosaku, T., T. Maejima y M. Kano** (2001). *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals*. Neuron **29**(3): 729-738.
- Olsen, O., K. A. Moore, M. Fukata, T. Kazuta, J. C. Trinidad, F. W. Kauer, M. Streuli, H. Misawa, A. L. Burlingame, R. A. Nicoll y D. S. Bredt** (2005). *Neurotransmitter release regulated by a MALS-liprin-alpha presynaptic complex*. J Cell Biol **170**(7): 1127-1134.
- Ottersen, O. P.** (1989). *Quantitative electron microscopic immunocytochemistry of neuroactive amino acids*. Anat Embryol (Berl) **180**(1): 1-15.
- Ottersen, O. P., J. Storm-Mathisen, C. Bramham, R. Torp, J. Laake y V. Gundersen** (1990). *A quantitative electron microscopic immunocytochemical study of the distribution and synaptic handling of glutamate in rat hippocampus*. Prog Brain Res **83**: 99-114.
- Ottersen, O. P., N. Zhang y F. Walberg** (1992). *Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum*. Neuroscience **46**(3): 519-534.
- Owen, D. J.** (2004). *Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation*. Biochem Soc Trans **32**(Pt 1): 1-14.
- Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, H. Yano, Y. Matsuura, T. Iwanaga, Y. Takai y S. Seino** (2000). *cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*. Nat Cell Biol **2**(11): 805-811.
- Paillart, C., J. Li, G. Matthews y P. Sterling** (2003). *Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse*. J Neurosci **23**(10): 4092-4099.
- Palkovits, M., P. Magyar y J. Szentagothai** (1971). *Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer*. Brain Res **32**(1): 15-30.
- Park, H., Y. Li y R. W. Tsien** (2012). *Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode*. Science **335**(6074): 1362-1366.
- Park, J. H., S. J. Kim, S. H. Park, D. G. Son, J. H. Bae, H. K. Kim, J. Han y D. K. Song** (2012). *Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic beta-cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A*. Endocrinology **153**(2): 574-582.

- Perez Bay, A. E., L. I. Ibanez y F. D. Marengo** (2007). *Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells*. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(5): C1509-1522.
- Perin, M. S., N. Brose, R. Jahn y T. C. Sudhof** (1991). *Domain structure of synaptotagmin (p65)*. *J Biol Chem* **266**(1): 623-629.
- Perin, M. S., V. A. Fried, G. A. Mignery, R. Jahn y T. C. Sudhof** (1990). *Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C*. *Nature* **345**(6272): 260-263.
- Pertwee, R. G., A. C. Howlett, M. E. Abood, S. P. Alexander, V. Di Marzo, M. R. Elphick, P. J. Greasley, H. S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie, R. Mechoulam y R. A. Ross** (2010). *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2)*. *Pharmacol Rev* **62**(4): 588-631.
- Pinheiro, P. y C. Mulle** (2006). *Kainate receptors*. *Cell Tissue Res* **326**(2): 457-482.
- Pitler, T. A. y B. E. Alger** (1992). *Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal pyramidal cells*. *J Neurosci* **12**(10): 4122-4132.
- Pitler, T. A. y B. E. Alger** (1994). *Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism*. *Neuron* **13**(6): 1447-1455.
- Poirier, M. A., W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin y M. K. Bennett** (1998). *The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle*. *Nat Struct Biol* **5**(9): 765-769.
- Porrill, J. y P. Dean** (2008). *Silent synapses, LTP, and the indirect parallel-fibre pathway: computational consequences of optimal cerebellar noise-processing*. *PLoS Comput Biol* **4**(5): e1000085.
- Puente, N., Y. Cui, O. Lassalle, M. Lafourcade, F. Georges, L. Venance, P. Grandes y O. J. Manzoni** (2011). *Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala*. *Nat Neurosci* **14**(12): 1542-1547.
- Radhakrishnan, A., A. Stein, R. Jahn y D. Fasshauer** (2009). *The Ca<sup>2+</sup> affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. *J Biol Chem* **284**(38): 25749-25760.
- Raimondi, A., S. M. Ferguson, X. Lou, M. Armbruster, S. Paradise, S. Giovedi, M. Messa, N. Kono, J. Takasaki, V. Cappello, E. O'Toole, T. A. Ryan y P. De Camilli** (2011). *Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis*. *Neuron* **70**(6): 1100-1114.
- Ramírez-Franco, J.** (2014). *Estudios del ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid

**Ramirez-Franco, J., B. Alonso, D. Bartolome-Martin, J. Sanchez-Prieto y M. Torres** (2013). *Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling*. BMC Neurosci **14**(1): 127.

**Ramirez-Franco, J., D. Bartolome-Martin, B. Alonso, M. Torres y J. Sanchez-Prieto** (2014). *Cannabinoid Type 1 Receptors Transiently Silence Glutamatergic Nerve Terminals of Cultured Cerebellar Granule Cells*. PLoS One **9**(2): e88594.

**Ramirez, D. M. y E. T. Kavalali** (2012). *The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling*. Cell Logist **2**(1): 20-27.

**Ramjaun, A. R. y P. S. McPherson** (1996). *Tissue-specific alternative splicing generates two synaptotagmin isoforms with differential membrane binding properties*. J Biol Chem **271**(40): 24856-24861.

**Ramón y Cajal, S.** (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados : estudios sobre el plan estructural y composicion histologica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiologicas fundadas en los nuevos descubrimientos*. Madrid, N. Moya.

**Ratnayaka, A., V. Marra, T. Branco y K. Staras** (2011). *Extrasynaptic vesicle recycling in mature hippocampal neurons*. Nat Commun **2**: 531.

**Regan, M. R., Y. H. Huang, Y. S. Kim, M. I. Dykes-Hoberg, L. Jin, A. M. Watkins, D. E. Bergles y J. D. Rothstein** (2007). *Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS*. J Neurosci **27**(25): 6607-6619.

**Rehmann, H., E. Arias-Palomo, M. A. Hadders, F. Schwede, O. Llorca y J. L. Bos** (2008). *Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B*. Nature **455**(7209): 124-127.

**Rhee, J. S., A. Betz, S. Pyott, K. Reim, F. Varoqueaux, I. Augustin, D. Hesse, T. C. Sudhof, M. Takahashi, C. Rosenmund y N. Brose** (2002). *Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs*. Cell **108**(1): 121-133.

**Richards, D. A., J. Bai y E. R. Chapman** (2005). *Two modes of exocytosis at hippocampal synapses revealed by rate of FM1-43 efflux from individual vesicles*. J Cell Biol **168**(6): 929-939.

**Richards, D. A., C. Guatimosim, S. O. Rizzoli y W. J. Betz** (2003). *Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction*. Neuron **39**(3): 529-541.

**Richmond, J. E., R. M. Weimer y E. M. Jorgensen** (2001). *An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming*. Nature **412**(6844): 338-341.

**Rizo, J., X. Chen y D. Arac** (2006). *Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release*. Trends Cell Biol **16**(7): 339-350.

- Rizzoli, S. O. y W. J. Betz** (2005). *Synaptic vesicle pools*. Nat Rev Neurosci **6**(1): 57-69.
- Robbe, D., M. Kopf, A. Remaury, J. Bockaert y O. J. Manzoni** (2002). *Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8384-8388.
- Rodriguez-Moreno, A. y J. Lerma** (1998). *Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function*. Neuron **20**(6): 1211-1218.
- Rodriguez-Moreno, A. y O. Paulsen** (2008). *Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors*. Nat Neurosci **11**(7): 744-745.
- Ronesi, J., G. L. Gerdeman y D. M. Lovinger** (2004). *Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport*. J Neurosci **24**(7): 1673-1679.
- Roos, A. y W. F. Boron** (1981). *Intracellular pH*. Physiol Rev **61**(2): 296-434.
- Rose, T., P. Schoenenberger, K. Jezek y T. G. Oertner** (2013). *Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses*. Neuron **77**(6): 1109-1121.
- Rosenmund, C. y C. F. Stevens** (1996). *Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses*. Neuron **16**(6): 1197-1207.
- Rozas, J. L., A. V. Paternain y J. Lerma** (2003). *Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors*. Neuron **39**(3): 543-553.
- Ryan, T. A., H. Reuter, B. Wendland, F. E. Schweizer, R. W. Tsien y S. J. Smith** (1993). *The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons*. Neuron **11**(4): 713-724.
- Safo, P. K., B. F. Cravatt y W. G. Regehr** (2006). *Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex*. Cerebellum **5**(2): 134-145.
- Safo, P. K. y W. G. Regehr** (2005). *Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD*. Neuron **48**(4): 647-659.
- Saheki, Y. y P. De Camilli** (2012). *Synaptic vesicle endocytosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a005645.
- Sakaba, T. y E. Neher** (2001). *Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse*. Neuron **32**(6): 1119-1131.
- Sakaba, T. y E. Neher** (2003). *Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse*. Nature **424**(6950): 775-778.



**Salin, P. A., R. C. Malenka y R. A. Nicoll** (1996). *Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses*. *Neuron* **16**(4): 797-803.

**Sankaranarayanan, S. y T. A. Ryan** (2001). *Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses*. *Nat Neurosci* **4**(2): 129-136.

**Schafer, M. K., H. Varoqui, N. Defamie, E. Weihe y J. D. Erickson** (2002). *Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons*. *J Biol Chem* **277**(52): 50734-50748.

**Schlosburg, J. E., J. L. Blankman, J. Z. Long, D. K. Nomura, B. Pan, S. G. Kinsey, P. T. Nguyen, D. Ramesh, L. Booker, J. J. Burston, E. A. Thomas, D. E. Selley, L. J. Sim-Selley, Q. S. Liu, A. H. Lichtman y B. F. Cravatt** (2010). *Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system*. *Nat Neurosci* **13**(9): 1113-1119.

**Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. von Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney y K. H. Jakobs** (2001). *A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase*. *Nat Cell Biol* **3**(11): 1020-1024.

**Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka y T. C. Sudhof** (2002). *RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone*. *Nature* **415**(6869): 321-326.

**Schoch, S., T. Mittelstaedt, P. S. Kaeser, D. Padgett, N. Feldmann, V. Chevalleyre, P. E. Castillo, R. E. Hammer, W. Han, F. Schmitz, W. Lin y T. C. Sudhof** (2006). *Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release*. *EMBO J* **25**(24): 5852-5863.

**Seal, R. P. y S. G. Amara** (1999). *Excitatory amino acid transporters: a family in flux*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 431-456.

**Sedj, S., T. Rose y M. Rupnik** (2005). *cAMP increases Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices*. *J Physiol* **567**(Pt 3): 799-813.

**Sehrawat, S., T. Hernandez, X. Cullere, M. Takahashi, Y. Ono, Y. Komarova y T. N. Mayadas** (2011). *AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties*. *Blood* **117**(2): 708-718.

**Seino, S. y T. Shibasaki** (2005). *PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis*. *Physiol Rev* **85**(4): 1303-1342.

**Serra-Pages, C., N. L. Kedersha, L. Fazikas, Q. Medley, A. Debant y M. Streuli** (1995). *The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions*. *EMBO J* **14**(12): 2827-2838.

**Sharma, M., J. Burre y T. C. Sudhof** (2011). *CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity*. *Nat Cell Biol* **13**(1): 30-39.

- Sharma, M., J. Burre y T. C. Sudhof** (2012). *Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration*. *Sci Transl Med* **4**(147): 147ra113.
- Shen, M., T. M. Piser, V. S. Seybold y S. A. Thayer** (1996). *Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures*. *J Neurosci* **16**(14): 4322-4334.
- Shibuki, K. y D. Okada** (1991). *Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum*. *Nature* **349**(6307): 326-328.
- Shin, O. H., J. Lu, J. S. Rhee, D. R. Tomchick, Z. P. Pang, S. M. Wojcik, M. Camacho-Perez, N. Brose, M. Machius, J. Rizo, C. Rosenmund y T. C. Sudhof** (2010). *Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca<sup>2+</sup> regulator of synaptic exocytosis*. *Nat Struct Mol Biol* **17**(3): 280-288.
- Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli y L. Brodin** (1997). *Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions*. *Science* **276**(5310): 259-263.
- Siksou, L., A. Triller y S. Marty** (2009). *An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies*. *J Neurochem* **108**(6): 1336-1342.
- Singla, S., A. C. Kreitzer y R. C. Malenka** (2007). *Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression*. *J Neurosci* **27**(19): 5260-5264.
- Sjostrom, P. J., G. G. Turrigiano y S. B. Nelson** (2003). *Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors*. *Neuron* **39**(4): 641-654.
- Smart, D., M. J. Gunthorpe, J. C. Jerman, S. Nasir, J. Gray, A. I. Muir, J. K. Chambers, A. D. Randall y J. B. Davis** (2000). *The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1)*. *Br J Pharmacol* **129**(2): 227-230.
- Smith, C. M., E. Radzio-Andzelm, Madhusudan, P. Akamine y S. S. Taylor** (1999). *The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication*. *Prog Biophys Mol Biol* **71**(3-4): 313-341.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst y J. E. Rothman** (1993). *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. *Nature* **362**(6418): 318-324.
- Song, Z. H. y T. I. Bonner** (1996). *A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2*. *Mol Pharmacol* **49**(5): 891-896.
- Staal, R. G., E. V. Mosharov y D. Sulzer** (2004). *Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore*. *Nat Neurosci* **7**(4): 341-346.
- Ster, J., F. De Bock, N. C. Guerineau, A. Janossy, S. Barrere-Lemaire, J. L. Bos, J. Bockaert y L. Fagni** (2007). *Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38*

*MAPK and modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2519-2524.

**Sternberg, S. R.** (1983). *Biomedical Image-Processing.* Computer **16**(1): 22-34.

**Stevens, C. F. y J. H. Williams** (2000). *"Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses.* Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12828-12833.

**Sudhof, T. C.** (2004). *The synaptic vesicle cycle.* Annu Rev Neurosci **27**: 509-547.

**Sudhof, T. C.** (2012). *Calcium control of neurotransmitter release.* Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(1): a011353.

**Sudhof, T. C.** (2012). *The presynaptic active zone.* Neuron **75**(1): 11-25.

**Sudhof, T. C.** (2013). *Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle.* Neuron **80**(3): 675-690.

**Sudhof, T. C.** (2014). *The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture).* Angew Chem Int Ed Engl **53**(47): 12696-12717.

**Südhof, Thomas C.** (2012). *The Presynaptic Active Zone.* Neuron **75**(1): 11-25.

**Sudhof, T. C. y J. Rizo** (2011). *Synaptic vesicle exocytosis.* Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(12): a005637.

**Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn y A. T. Brunger** (1998). *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.* Nature **395**(6700): 347-353.

**Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund y R. Jahn** (2000). *Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons.* Nature **407**(6801): 189-194.

**Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund y R. Jahn** (2001). *Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2).* J Neurosci **21**(22): RC182.

**Tang, J., A. Maximov, O. H. Shin, H. Dai, J. Rizo y T. C. Sudhof** (2006). *A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis.* Cell **126**(6): 1175-1187.

**Tanimura, A., M. Yamazaki, Y. Hashimoto, M. Uchigashima, S. Kawata, M. Abe, Y. Kita, K. Hashimoto, T. Shimizu, M. Watanabe, K. Sakimura y M. Kano** (2010). *The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase  $\alpha$  mediates retrograde suppression of synaptic transmission.* Neuron **65**(3): 320-327.

**Taru, H. y Y. Jin** (2011). *The Liprin homology domain is essential for the homomeric interaction of SYD-2/Liprin- $\alpha$  protein in presynaptic assembly.* J Neurosci **31**(45): 16261-16268.

- Teng, H., M. Y. Lin y R. S. Wilkinson** (2007). *Macroendocytosis and endosome processing in snake motor boutons*. J Physiol **582**(Pt 1): 243-262.
- tom Dieck, S., L. Sanmarti-Vila, K. Langnaese, K. Richter, S. Kindler, A. Soyke, H. Wex, K. H. Smalla, U. Kampf, J. T. Franzer, M. Stumm, C. C. Garner y E. D. Gundelfinger** (1998). *Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals*. J Cell Biol **142**(2): 499-509.
- Tornqvist, H. y P. Belfrage** (1976). *Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue*. J Biol Chem **251**(3): 813-819.
- Traub, L. M.** (2003). *Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection*. J Cell Biol **163**(2): 203-208.
- Tresguerres, J. A. F., C. Ariznavarreta, V. Cachofeiro, D. Cardinali, E. Escrich, P. Gil Loyzaga, V. Lahera Juliá, F. Mora Teruel, M. Romano Pardo y J. Tamargo Menéndez** (2005). *Fisiología Humana*. 3ª Edición. Eds. Álvarez, M., Femenía, R., Sánchez, Cristina y O. Sánchez. México, Mc Graw Hill.
- Tsalkova, T., F. C. Mei, S. Li, O. G. Chepurny, C. A. Leech, T. Liu, G. G. Holz, V. L. Woods, Jr. y X. Cheng** (2012). *Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP*. Proc Natl Acad Sci U S A **109**(45): 18613-18618.
- Tsetsenis, T., T. J. Younts, C. Q. Chiu, P. S. Kaeser, P. E. Castillo y T. C. Sudhof** (2011). *Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): 14300-14305.
- Tzounopoulos, T., R. Janz, T. C. Sudhof, R. A. Nicoll y R. C. Malenka** (1998). *A role for cAMP in long-term depression at hippocampal mossy fiber synapses*. Neuron **21**(4): 837-845.
- Ulucan, C., X. Wang, E. Baljinnyam, Y. Bai, S. Okumura, M. Sato, S. Minamisawa, S. Hirotsu y Y. Ishikawa** (2007). *Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1662-1672.
- Uriu, Y., S. Kiyonaka, T. Miki, M. Yagi, S. Akiyama, E. Mori, A. Nakao, A. M. Beedle, K. P. Campbell, M. Wakamori y Y. Mori** (2010). *Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels*. J Biol Chem **285**(28): 21750-21767.
- Valtorta, F., F. T. Tarelli, L. Campanati, A. Villa y P. Greengard** (1989). *Synaptophysin and synapsin I as tools for the study of the exo-endocytotic cycle*. Cell Biol Int Rep **13**(12): 1023-1038.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel y K. A. Sharkey** (2005). *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science **310**(5746): 329-332.

- Vandevoorde, S. y D. M. Lambert** (2007). *The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out*. Chem Biodivers **4**(8): 1858-1881.
- Varoqueaux, F., A. Sigler, J. S. Rhee, N. Brose, C. Enk, K. Reim y C. Rosenmund** (2002). *Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 9037-9042.
- Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze y T. C. Sudhof** (2000). *Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion*. Science **287**(5454): 864-869.
- Verstreken, P., O. Kjaerulff, T. E. Lloyd, R. Atkinson, Y. Zhou, I. A. Meinertzhagen y H. J. Bellen** (2002). *Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release*. Cell **109**(1): 101-112.
- Vincent, P., C. M. Armstrong y A. Marty** (1992). *Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization*. J Physiol **456**: 453-471.
- Voglmaier, S. M., K. Kam, H. Yang, D. L. Fortin, Z. Hua, R. A. Nicoll y R. H. Edwards** (2006). *Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling*. Neuron **51**(1): 71-84.
- Wager-Miller, J., R. Westenbroek y K. Mackie** (2002). *Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example*. Chem Phys Lipids **121**(1-2): 83-89.
- Wagh, D. A., T. M. Rasse, E. Asan, A. Hofbauer, I. Schwenkert, H. Durrbeck, S. Buchner, M. C. Dabauvalle, M. Schmidt, G. Qin, C. Wichmann, R. Kittel, S. J. Sigrist y E. Buchner** (2006). *Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in Drosophila*. Neuron **49**(6): 833-844.
- Walther, K., M. K. Diril, N. Jung y V. Haucke** (2004). *Functional dissection of the interactions of stonin 2 with the adaptor complex AP-2 and synaptotagmin*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 964-969.
- Walther, K., M. Krauss, M. K. Diril, S. Lemke, D. Ricotta, S. Honing, S. Kaiser y V. Haucke** (2001). *Human stoned B interacts with AP-2 and synaptotagmin and facilitates clathrin-coated vesicle uncoating*. EMBO Rep **2**(7): 634-640.
- Wang, S. S., L. Khiroug y G. J. Augustine** (2000). *Quantification of spread of cerebellar long-term depression with chemical two-photon uncaging of glutamate*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8635-8640.
- Wang, X., M. Kibschull, M. M. Laue, B. Lichte, E. Petrasch-Parwez y M. W. Kilimann** (1999). *Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin*. J Cell Biol **147**(1): 151-162.

**Wang, Y., X. Liu, T. Biederer y T. C. Sudhof** (2002). *A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14464-14469.

**Wang, Y., M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann y T. C. Sudhof** (1997). *Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion*. *Nature* **388**(6642): 593-598.

**Wang, Y. y T. C. Sudhof** (2003). *Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins*. *Genomics* **81**(2): 126-137.

**Wang, Y., S. Sugita y T. C. Sudhof** (2000). *The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins*. *J Biol Chem* **275**(26): 20033-20044.

**Wang, Y. T. y D. J. Linden** (2000). *Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis*. *Neuron* **25**(3): 635-647.

**Watanabe, S., B. R. Rost, M. Camacho-Perez, M. W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund y E. M. Jorgensen** (2013). *Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses*. *Nature* **504**(7479): 242-247.

**Watanabe, S., T. Trimbuch, M. Camacho-Perez, B. R. Rost, B. Brokowski, B. Sohl-Kielczynski, A. Felies, M. W. Davis, C. Rosenmund y E. M. Jorgensen** (2014). *Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes*. *Nature* **515**(7526): 228-233.

**Weisskopf, M. G., P. E. Castillo, R. A. Zalutsky y R. A. Nicoll** (1994). *Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP*. *Science* **265**(5180): 1878-1882.

**Wenzel, E. M., A. Morton, K. Ebert, O. Welzel, J. Kornhuber, M. A. Cousin y T. W. Groemer** (2012). *Key physiological parameters dictate triggering of activity-dependent bulk endocytosis in hippocampal synapses*. *PLoS One* **7**(6): e38188.

**Whitlock, J. R., A. J. Heynen, M. G. Shuler y M. F. Bear** (2006). *Learning induces long-term potentiation in the hippocampus*. *Science* **313**(5790): 1093-1097.

**Wilson, R. I. y R. A. Nicoll** (2001). *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. *Nature* **410**(6828): 588-592.

**Willox, A. K. y S. J. Royle** (2012). *Stonin 2 is a major adaptor protein for clathrin-mediated synaptic vesicle retrieval*. *Curr Biol* **22**(15): 1435-1439.

**Wojtowicz, J. M., B. R. Smith y H. L. Atwood** (1991). *Activity-dependent recruitment of silent synapses*. *Ann N Y Acad Sci* **627**: 169-179.

**Wu, W. y L. G. Wu** (2007). *Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10234-10239.

- Xi, Z. X., X. Q. Peng, X. Li, R. Song, H. Y. Zhang, Q. R. Liu, H. J. Yang, G. H. Bi, J. Li y E. L. Gardner** (2011). *Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice*. *Nat Neurosci* **14**(9): 1160-1166.
- Xia, J., H. J. Chung, C. Wihler, R. L. Huganir y D. J. Linden** (2000). *Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins*. *Neuron* **28**(2): 499-510.
- Xing, Y., T. Bocking, M. Wolf, N. Grigorieff, T. Kirchhausen y S. C. Harrison** (2010). *Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly*. *EMBO J* **29**(3): 655-665.
- Xue, L., J. Sheng, X. S. Wu, W. Wu, F. Luo, W. Shin, H. C. Chiang y L. G. Wu** (2013). *Most vesicles in a central nerve terminal participate in recycling*. *J Neurosci* **33**(20): 8820-8826.
- Xue, M., T. K. Craig, J. Xu, H. T. Chao, J. Rizo y C. Rosenmund** (2010). *Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity*. *Nat Struct Mol Biol* **17**(5): 568-575.
- Xue, M., K. Reim, X. Chen, H. T. Chao, H. Deng, J. Rizo, N. Brose y C. Rosenmund** (2007). *Distinct domains of complexin I differentially regulate neurotransmitter release*. *Nat Struct Mol Biol* **14**(10): 949-958.
- Yang, Y., X. Shu, D. Liu, Y. Shang, Y. Wu, L. Pei, X. Xu, Q. Tian, J. Zhang, K. Qian, Y. X. Wang, R. S. Petralia, W. Tu, L. Q. Zhu, J. Z. Wang y Y. Lu** (2012). *EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation*. *Neuron* **73**(4): 774-788.
- Yao, J., J. Qi y G. Chen** (2006). *Actin-dependent activation of presynaptic silent synapses contributes to long-term synaptic plasticity in developing hippocampal neurons*. *J Neurosci* **26**(31): 8137-8147.
- Yasuda, H., Y. Huang y T. Tsumoto** (2008). *Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 3106-3111.
- Yoshida, T., M. Fukaya, M. Uchigashima, E. Miura, H. Kamiya, M. Kano y M. Watanabe** (2006). *Localization of diacylglycerol lipase- $\alpha$  around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor*. *J Neurosci* **26**(18): 4740-4751.
- Yoshihara, M., K. Suzuki y Y. Kidokoro** (2000). *Two independent pathways mediated by cAMP and protein kinase A enhance spontaneous transmitter release at Drosophila neuromuscular junctions*. *J Neurosci* **20**(22): 8315-8322.
- Yu, E., E. Kanno, S. Choi, M. Sugimori, J. E. Moreira, R. R. Llinas y M. Fukuda** (2008). *Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41): 16003-16008.

## BIBLIOGRAFÍA

**Zhang, J. Z., B. A. Davletov, T. C. Sudhof y R. G. Anderson** (1994). *Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling*. Cell **78**(5): 751-760.

**Zhang, Q., Y. Li y R. W. Tsien** (2009). *The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles*. Science **323**(5920): 1448-1453.

**Zhao, K., R. Wen, X. Wang, L. Pei, Y. Yang, Y. Shang, N. Bazan, L. Q. Zhu, Q. Tian y Y. Lu** (2013). *EPAC inhibition of SUR1 receptor increases glutamate release and seizure vulnerability*. J Neurosci **33**(20): 8861-8865.

**Zhen, M. y Y. Jin** (1999). *The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in C. elegans*. Nature **401**(6751): 371-375.



